

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
1 novembre 2001 (01.11.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 01/81446 A1**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :  
C08G 61/12, H01B 1/12

(74) Mandataire : GERMAIN & MAUREAU; BP 6153,  
F-69466 LYON Cedex 06 (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR01/01241

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,  
DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,  
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,  
NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,  
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) Date de dépôt international : 23 avril 2001 (23.04.2001)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
00/05195 21 avril 2000 (21.04.2000) FR

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien  
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,  
MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,  
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) : BIO  
MERIEUX [FR/FR]; Chemin de l'Orme, F-69280  
MARCY L'ETOILE (FR).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (*pour US seulement*) : GARNIER,  
Francis [FR/FR]; 17 Villa Rémy, F-94500 CHAMPIGNY  
SUR MARNE (FR).

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: ELECTROACTIVE COMPLEX, ELECTROACTIVE PROBE AND PREPARATION METHOD

(54) Titre : COMPLEXE ELECTROACTIF, SONDE ELECTROACTIVE ET PROCÉDE DE PREPARATION

(57) Abstract: The invention concerns an electroactive complex, consisting of an electroactive homopolymer or copolymer polymer of at least two monomers, and anti-ligand and a ligand having specifically interacted with said antiligand, and further at least an electron donor group, and an electroactive probe, consisting of said polymer said antiligand capable of interacting specifically with said ligand and at least an electron donor group.

(57) Abrégé : L'invention concerne un complexe électroactif, constitué par un polymère homopolymère ou copolymère électroactif d'au moins deux monomères, un anti-ligand et un ligand ayant spécifiquement interagi avec ledit anti-ligand, et en outre au moins un groupe électrodonneur, ainsi qu'une sonde électroactive, constituée par ledit polymère ledit anti-ligand susceptible d'interagir spécifiquement avec ledit ligand et au moins un dit groupement électrodonneur.

WO 01/81446 A1

## COMPLEXE ELECTROACTIF, SONDE ELECTROACTIVE ET PROCEDE DE PREPARATION

5 L'invention a trait aux électrodes organiques élaborées à partir de polymères électroactifs sur lesquels sont liés des anti-ligands destinés à interagir spécifiquement avec des ligands.

L'interaction spécifique du l'anti-ligand avec le ligand entraîne une variation sensible et sélective des propriétés électrochimiques du polymère électroactif, telle qu'une diminution de l'électroactivité dudit polymère. Cette variation, qui dépend de la concentration en ligand greffé, est observée, éventuellement mesurée, et directement corrélée à la quantité de ligand greffé. Une des applications essentielles de cette technique réside donc dans la détection, l'identification, et éventuellement  
10 le dosage, d'un ligand, présent dans un échantillon biologique.

La variation précitée est de type potentiométrique, telle qu'une variation du potentiel d'oxydation du polymère électroactif avant et après interaction, ou de type ampérométrique, telle qu'une variation du courant d'oxydation ou de réduction du polymère avant et après hybridation,  
15 déterminé à un potentiel déterminé.

Pour caractériser précisément la réponse électrochimique du polymère, celui-ci doit présenter une forte électroactivité.

C'est donc un des buts de l'invention d'apporter une sonde à base de polymère électroactif sur lequel est fixé au moins un anti-ligand, cette sonde possédant une forte électroactivité.  
25

Selon le document WO-A-95/29199, on connaît un polypyrrole, constitué par des monomères consistant chacun en un noyau pyrrole substitué de manière covalente sur le carbone en position 3 du noyau pyrrole, par un polynucléotide sonde.

30 Le polypyrrole ainsi obtenu est appliqué à la détection, et éventuellement le dosage, de ligands, in vitro ou in vivo.

On est cependant toujours dans l'attente de l'élaboration de polymères possédant de meilleures propriétés électroactives.

Selon l'invention, on apporte un polymère électroactif, modifié, porteur d'au moins un anti-ligand, et dont la sensibilité peut être de l'ordre  
35

de cent fois supérieure à celle d'un polymère électroactif modifié connu, tel qu'un polypyrrole qui fait l'objet du document WO-A-95/29199.

Ainsi, un premier objet de l'invention est un complexe électroactif, constitué par un polymère homopolymère ou copolymère électroactif d'au moins deux monomères, un anti-ligand et un ligand ayant spécifiquement interagi avec ledit anti-ligand, ledit complexe comprenant en outre au moins un groupe électrodonneur.

Selon l'invention, le groupement électrodonneur est avantageusement choisi parmi le ferrocène, la quinone et les dérivés de ceux-ci, et/ou le polymère électroactif est de préférence choisi parmi le polypyrrole, le polyacétylène, la polyazine, le poly(p-phénylène), le poly(p-phénylène vinylène), le polypyrène, le polythiophène, le polyfuranne, le polysélénophène, la polypyridazine, le polycarbazole, la polyaniline, les polynucléotides bicaténaires.

Avant de détailler l'invention, certains termes employés dans la description et les revendications sont ci-après définis.

Par « groupement électrodonneur », on entend un couple redox présentant une vague d'oxydation étroite, rapide et réversible, tel que le ferrocène, la quinone et leurs dérivés, par exemple leurs dérivés substitués.

Les termes « anti-ligand » et « ligand » font indifféremment référence à des molécules biologiques telles que des polynucléotides ou des peptides, mais aussi à des molécules chimiques.

L'anti-ligand est susceptible d'interagir spécifiquement avec le ligand pour former un conjugué ligand / anti-ligand. A titre d'exemples de conjugués, on peut citer tout couple peptide / anticorps, anticorps / haptène, hormone / récepteur, polynucléotide / polynucléotide, polynucléotide / acide nucléique et analogues.

Le terme « polynucléotide » tel qu'employé selon l'invention désigne un enchaînement d'au moins cinq nucléotides (désoxyribonucléotides ou ribonucléotides), naturels ou modifiés, susceptible de s'hybrider, dans des conditions appropriées d'hybridation, avec un polynucléotide au moins partiellement complémentaire. Par nucléotides modifiés, on entend par exemple, un nucléotide comportant une base modifiée et/ou comportant une modification au niveau de la liaison internucléotidique et/ou au niveau du squelette. A titre d'exemple de bases modifiées, on peut citer l'inosine, la méthyl-5-désoxycytidine, la

diméthylamino-5-désoxyuridine, la diamino-2,6-purine et la bromo-5-désoxyuridine. Pour illustrer une liaison internucléotidique modifiée, on peut mentionner les liaisons phosphorothioate, H-phosphonate et alkyl-phosphonate. Les alpha-oligonucléotides tels que ceux décrits dans  
5 FR-A-2 607 507 et les PNA qui font l'objet de l'article de M. Egholm et al., J. Am. Chem. Soc. (1992) 114, 1895-1897, sont des exemples de polynucléotides constitués de nucléotides dont le squelette est modifié.

Le terme « peptide » signifie notamment tout enchaînement d'au moins deux acides aminés, tels que protéine, fragment de protéine,  
10 oligopeptide, qui a été extrait, séparé, isolé ou synthétisé, comme un peptide obtenu par synthèse chimique ou par expression dans un organisme recombinant. Sont inclus aussi, tout peptide dans la séquence duquel un ou plusieurs acides aminés de la série L sont remplacés par un ou plusieurs acides aminés de la série D, et vice-versa ; tout peptide dont  
15 l'une au moins des liaisons CO-NH est remplacée par une liaison NH-CO ; tout peptide dont l'une au moins des liaisons CO-NH est remplacée par une liaison NH-CO, la chiralité de chaque résidu aminoacyle, qu'il soit impliqué ou non dans une ou plusieurs dites liaisons CO-NH, étant soit conservée, soit inversée par rapport aux résidus aminoacyles constituant un peptide de  
20 référence (ou immunorétroïdes) ; et tout mimotope.

Pour illustrer les diverses classes des peptides concernés, on peut mentionner les hormones adrénocorticotropiques ou leurs fragments, les analogues d'angiotensine et leurs inhibiteurs, les peptides natriurétiques, la bradykinine et ses dérivés peptidiques, les peptides  
25 chimiotactiques, la dynorphine et ses dérivés, les endorphines et leurs dérivés, les encéphalines et leurs dérivés, les inhibiteurs d'enzymes, les fragments de fibronectine et leurs dérivés, les peptides gastro-intestinaux, les peptide opioïdes, l'oxytocine, la vasopressine, la vasotocine et leurs dérivés, les protéines kinase.

30 Le terme « anticorps » définit tout anticorps monoclonal ou polyclonal, tout fragment d'undit anticorps tel que les fragments Fab, Fab'2 ou Fc, ainsi que tout anticorps obtenu par modification ou recombinaison génétique.

Les termes « greffer », « lier » et « fixer » en l'absence de toute  
35 indication, sont indifféremment employés dans le présent texte pour

désigner une relation entre deux entités, sans en définir la nature chimique. Il peut ainsi s'agir d'une liaison faible ou d'une liaison covalente.

Un groupe de liaison selon l'invention relie, par liaison covalente, deux entités chimiques, après interaction desdites deux entités, l'une au moins ayant été au préalable activée ou activable, en vue de cette interaction, par un groupe activé ou activable. Le groupe de liaison peut donc résulter de la réaction d'undit groupe activé ou activable d'une entité sur une fonction réactive de l'autre entité, et vice-versa, ou de la réaction d'undit groupe activé ou activable d'une entité sur un autre dit groupe activé ou activable de l'autre entité.

Par groupe activé, on entend un groupe permettant, par son intermédiaire, l'interaction de l'entité sur lequel il est fixé avec une autre entité. A titre d'exemple, il peut s'agir d'un groupe ester activé tel que le groupe  $-CO-[O-N\text{-phthalimide}]$ . Par groupe activable, on comprend un groupe qui peut être transformé en un groupe activé, par exemple dans certaines conditions réactionnelles ou lors de la mise en contact avec un groupe activé susceptible d'interagir avec lui.

Le complexe de l'invention tel que défini précédemment répond avantageusement aux caractéristiques suivantes considérées seules ou en combinaison.

Le ligand et l'anti-ligand sont des molécules biologiques, notamment choisies parmi les polynucléotides et les polypeptides, qui peuvent être marqués par un traceur susceptible de générer directement ou indirectement un signal.

Le complexe présente l'une des structures suivantes : le groupement électrodonneur est lié, directement ou indirectement, d'une part au polymère électroactif et d'autre part à l'anti-ligand ou au ligand, ou bien le groupement électrodonneur est lié, directement ou indirectement, à l'anti-ligand, ledit anti-ligand étant lui-même lié, directement ou indirectement, au polymère électroactif, ou bien le groupement électrodonneur est lié, directement ou indirectement, au ligand ayant interagi avec l'anti-ligand, ledit anti-ligand étant lié, directement ou indirectement, au polymère électroactif.

Lorsque le groupement électrodonneur est lié au polymère électroactif, il l'est préférentiellement de manière covalente, par l'intermédiaire d'un premier groupe de liaison.

Lorsque l'anti-ligand ou le ligand sont liés au groupement électrodonneur et/ou au polymère électroactif, ils le sont avantageusement de manière covalente, par l'intermédiaire respectivement d'un second et d'un troisième groupes de liaison.

5 Les premier et/ou second et/ou troisième groupes de liaison relient respectivement, le groupe électrodonneur au polymère électroactif, le groupe électrodonneur à l'anti-ligand ou au ligand, et l'anti-ligand ou le ligand au polymère électroactif, par l'intermédiaire d'un bras de couplage.

10 Dans la structure du complexe de l'invention, selon laquelle le groupe électrodonneur est lié au ligand, il peut aussi l'être par l'intermédiaire d'un support inerte, par exemple une bille de polystyrène, une bille magnétique ou une bille de verre, ou d'un support biologique, telle qu'une cellule, dans laquelle le groupe électrodonneur a été internalisé.

15 Selon un complexe préféré de l'invention, le polymère électroactif est un polypyrrole constitué d'au moins deux monomères consistant chacun en un noyau pyrrole, et le groupe électrodonneur est le ferrocène, et, en particulier, l'anti-ligand est un polynucléotide sonde et le ligand est un polynucléotide cible, au moins partiellement hybridé audit anti-ligand.

20 Ce complexe préféré présente en outre les caractéristiques suivantes, considérées seules ou en combinaison.

25 Le ferrocène est lié d'une part au polynucléotide sonde et d'autre part au noyau pyrrole d'un monomère du polypyrrole, auquel cas le polynucléotide sonde est fixé sur le carbone en position 1 d'un des noyaux cyclopentadiène du ferrocène, et le ferrocène est fixé sur le noyau pyrrole par l'intermédiaire du carbone en position 1' de l'autre noyau du cyclopentadiène,

ou bien

30 le polynucléotide sonde est lié au ferrocène et au noyau pyrrole dudit monomère au moins, auquel cas le polynucléotide sonde est fixé sur le carbone en position 1 d'un des noyaux cyclopentadiène du ferrocène.

Le noyau pyrrole est de préférence substitué sur le carbone en position 3.

35 Le polypyrrole est un copolymère et comprend un monomère dont le noyau pyrrole est substitué par un groupe  $-\text{CH}_2\text{-COOH}$  ou  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{OH}$ .

Avantageusement, le premier groupe de liaison entre le ferrocène et le noyau pyrrole, est le groupe  $-\text{CONH-CH}_2-$  et/ou le second groupe de liaison, entre le ferrocène et le polynucléotide sonde ou le polynucléotide cible est le groupe  $-\text{CO}-$  et/ou le troisième groupe de liaison entre le polynucléotide sonde ou le polynucléotide cible et le noyau pyrrole, est le groupe  $-\text{CH}_2-\text{CO}-$ .

Les premier et/ou second et/ou troisième groupes de liaison qui relient, indirectement, respectivement le ferrocène au noyau pyrrole, le ferrocène au polynucléotide sonde ou au polynucléotide cible et le noyau pyrrole au polynucléotide sonde ou au polynucléotide cible, peuvent le faire par l'intermédiaire d'un bras de couplage. Celui-ci est avantageusement une chaîne hydrocarbonée saturée ayant au moins deux atomes de carbone, de préférence au moins 2 ou 3 atomes de carbone.

Le polynucléotide sonde ou le polynucléotide cible est fixé au ferrocène et/ou au noyau pyrrole du monomère au moins, par l'intermédiaire respectivement du second et/ou du troisième groupes de liaison et d'au moins une des fonctions aminées du polynucléotide sonde ou du polynucléotide cible.

Un autre objet de l'invention est une sonde électroactive, constituée par un polymère homopolymère ou copolymère, électroactif, d'au moins deux monomères, un anti-ligand susceptible d'interagir spécifiquement avec un ligand, ladite sonde comprenant en outre au moins un groupement électrodonneur.

Elle possède avantageusement au moins l'une quelconque des caractéristiques suivantes.

Le polymère électroactif est choisi parmi le polypyrrole, le polyacétylène, la polyazine, le poly(p-phénylène), le poly(p-phénylène vinylène), le polypyrène, le polythiophène, le polyfuranne, le polysélenophène, la polypyridazine, le polycarbazole, la polyaniline, les polynucléotides bicaténaires et/ou le groupe électrodonneur est choisi parmi le ferrocène, la quinone et les dérivés de ceux-ci, et/ou l'anti-ligand est une molécule biologique notamment choisie parmi les polynucléotides et les polypeptides, et est éventuellement marqué par un traceur susceptible de générer directement ou indirectement un signal.

Le groupement électrodonneur est lié, directement ou indirectement, d'une part au polymère électroactif et d'autre part à l'anti-

ligand. Dans ce cas, le groupement électrodonneur est de préférence lié de manière covalente au polymère électroactif, par l'intermédiaire d'un premier groupe de liaison, ou bien

le groupement électrodonneur est lié, directement ou  
5 indirectement, à l'anti-ligand, ledit anti-ligand étant lui-même lié, directement ou indirectement, au polymère électroactif.

L'anti-ligand est lié de manière covalente au groupement électrodonneur, par l'intermédiaire d'un second groupe de liaison et/ou l'anti-ligand est lié de manière covalente au polymère électroactif, par  
10 l'intermédiaire d'un troisième groupe de liaison.

Les premier et/ou second et/ou troisième groupes de liaison relient respectivement, le groupe électrodonneur au polymère électroactif, le groupe électrodonneur à l'anti-ligand et l'anti-ligand au polymère électroactif, par l'intermédiaire d'un bras de couplage.

15 Une sonde avantageuse de l'invention comprend un polypyrrole constitué d'au moins deux monomères consistant chacun en un noyau pyrrole, le ferrocène, et un anti-ligand particulier consistant en un polynucléotide sonde, susceptible d'hybrider un polynucléotide cible, dans des conditions d'hybridation appropriées.

20 Le polynucléotide sonde ( $PN_{\text{sonde}}$ ) peut être fixé entre le ferrocène (Fe) et le noyau pyrrole (P) dudit monomère au moins, ou bien être fixé sur le ferrocène, celui-ci étant fixé sur le noyau pyrrole.

Lorsque le polynucléotide sonde est fixé entre le ferrocène et le noyau pyrrole, selon une structure que l'on désignera par  $P-PN_{\text{sonde}}-Fe$ , la  
25 sonde de l'invention répond aux caractéristiques suivantes considérées seules ou combinées :

le polynucléotide sonde est fixé sur le carbone en position 1 d'un des noyaux cyclopentadiène du ferrocène ;

le polynucléotide sonde est, directement ou indirectement, fixé  
30 au noyau pyrrole, par l'intermédiaire d'un troisième groupe de liaison ; celui-ci est avantageusement le groupe  $-CH_2-CO-$ .

Lorsque le polynucléotide sonde est fixé sur le ferrocène lui-même étant fixé sur le noyau pyrrole, selon une structure que l'on désignera par  $P-Fe-PN_{\text{sonde}}$ , la sonde de l'invention répond aux  
35 caractéristiques suivantes considérées seules ou combinées :

le polynucléotide sonde est fixé sur le carbone en position 1 d'un des noyaux cyclopentadiène du ferrocène, et le ferrocène est fixé sur le noyau pyrrole par l'intermédiaire du carbone en position 1' de l'autre noyau du cyclopentadiène ;

5 le ferrocène est, directement ou indirectement, fixé au noyau pyrrole dudit monomère au moins, par l'intermédiaire d'un premier groupe de liaison ; celui-ci est avantageusement le groupe  $-\text{CONH}-\text{CH}_2-$ .

Quelle que soit la structure de la sonde, le ferrocène est, directement ou indirectement, fixé au polynucléotide sonde, par  
10 l'intermédiaire d'un second groupe de liaison qui consiste de préférence en le groupe  $-\text{CO}-$ .

Par ailleurs, le polynucléotide sonde est fixé au noyau pyrrole du monomère au moins et/ou au ferrocène, par l'intermédiaire respectivement du troisième et/ou du second groupes de liaison et l'intermédiaire d'au  
15 moins une des fonctions aminées du polynucléotide sonde.

Selon une structure avantageuse d'une sonde de l'invention, les premier et/ou second et/ou troisième groupes de liaison précités, relient, indirectement, respectivement le ferrocène au noyau pyrrole, le polynucléotide sonde au noyau pyrrole et le polynucléotide sonde au noyau  
20 pyrrole, par l'intermédiaire d'un bras de couplage.

Ce bras de couplage est de préférence une chaîne hydrocarbonée saturée ayant au moins deux atomes de carbone, de préférence au moins 2 ou 3 atomes de carbone.

Le polypyrrole modifié selon l'invention peut être un  
25 homopolymère ou un copolymère. Le noyau pyrrole est substitué sur le carbone en position 3, donc tout copolymère de l'invention présentera au moins deux monomères dont un au moins n'est pas substitué sur ladite position, ou bien il présentera au moins deux monomères différemment substitués sur ladite position, les substituants  $\text{PN}_{\text{sonde}}$  étant différents et/ou  
30 l'assemblage des substituants  $\text{PN}_{\text{sonde}}$  et Fe étant différents sur le noyau pyrrole des monomères et/ou les premier et/ou second et/ou troisième groupes de liaison et/ou les bras de couplage étant différents. En plus des monomères modifiés selon l'invention, un copolymère peut comprendre au moins un monomère dont le noyau pyrrole est substitué par un groupe -  
35  $\text{CH}_2-\text{COOH}$  ou  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$ .

Lorsque tous les monomères du polymère sont modifiés à l'identique, on obtient un polypyrrole homopolymère de l'invention.

L'invention concerne aussi un procédé pour préparer une sonde de l'invention.

5 Si les monomères modifiés du polypyrrole ont tous la structure  $P-PN_{\text{sonde}}-Fe$ , le procédé comprend alors les étapes suivantes :

- 10 (a) On dispose d'un polypyrrole homopolymère ou copolymère constitué par au moins deux monomères consistant chacun en un noyau pyrrole, dont au moins un est substitué sur le carbone en position 3 par un polynucléotide sonde,
- (b) On obtient le ferrocène comportant sur le carbone en position 1 d'un des noyaux cyclopentadiène, au moins un groupe activé ou activable, et
- 15 (c) On met en contact le polypyrrole homopolymère ou copolymère, substitué par un polynucléotide sonde, avec le ferrocène comportant ledit groupe activé ou activable.

Si les monomères modifiés du polypyrrole ont tous la structure  $P-Fe-PN_{\text{sonde}}$ , le procédé comprend alors les étapes suivantes :

- 20 (a) On dispose de ferrocène comportant au moins deux groupements activés ou activables, au moins l'un étant fixé sur le carbone en position 1 d'un des noyaux cyclopentadiène et l'autre étant fixé sur le carbone en position 1' de l'autre noyau cyclopentadiène du ferrocène,
- 25 (b) On dispose d'un monomère consistant en un noyau pyrrole substitué sur le carbone en position 3, par un groupe activé ou activable,
- (c) On fait réagir un excès du ferrocène comportant des groupes activés ou activables avec le monomère substitué,
- 30 (d) On effectue une électropolymérisation du composé obtenu en (c), et
- (e) On met en contact le polymère obtenu à l'étape (d) avec un polynucléotide sonde.

Les procédés de préparation de sonde de l'invention sont en outre avantageusement caractérisés comme suit :

35 Le ou les groupes activés ou activables du ferrocène, identiques ou différents, sont de préférence un groupe ester activé ou activable, et de

préférence le groupe  $-\text{CO}-[\text{N-hydroxy-phtalimide}]$  ; ils sont avantageusement fixés sur le ferrocène par l'intermédiaire d'un bras de couplage.

Le groupe activé du noyau pyrrole est  $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ .

5 Le groupe activé ou activable du noyau pyrrole, est fixé sur celui-ci par l'intermédiaire d'un bras de couplage.

Un bras de couplage préféré est une chaîne hydrocarbonée saturée ayant au moins deux atomes de carbone, de préférence au moins 2 ou 3 atomes de carbone.

10 L'étape d'électropolymérisation est réalisée en utilisant des techniques bien connues de l'homme du métier. Par exemple, elle peut être conduite en soumettant les monomères à des variations de potentiel électrique suffisantes pour provoquer la polymérisation par une oxydation et une réduction successives ; ou bien par polymérisation à courant  
15 (chronopotentiométrie) ou à potentiel (chronoampérométrie) imposés.

Un autre objet de l'invention est un composé ligand / ferrocène, en tant que produit intermédiaire, consistant en un ligand lié, directement ou indirectement, à un groupe électrodonneur tel que le ferrocène, la quinone ou les dérivés de ceux-ci. En particulier, -ce composé est un  
20 composé polynucléotide / ferrocène, en tant qu'intermédiaire de préparation d'une sonde de l'invention dans le procédé de préparation d'une sonde  $\text{P-PN}_{\text{sonde}}\text{-Fe}$  de l'invention. Il consiste en un polynucléotide fixé sur le carbone en position 1 d'un des noyaux cyclopentadiène du ferrocène, par l'intermédiaire d'un second groupe de liaison qui est de préférence le  
25 groupe  $-\text{CO}-$ .

Ce second groupe de liaison peut relier indirectement le ferrocène et le polynucléotide sonde, par l'intermédiaire d'un bras de couplage qui consiste avantageusement en une chaîne hydrocarbonée saturée ayant au moins deux atomes de carbone, de préférence au moins 2  
30 ou 3 atomes de carbone.

Une sonde de l'invention présente des applications diagnostiques. Aussi, l'invention concerne encore un procédé de détection d'un polynucléotide cible dans un échantillon biologique, selon lequel on met en contact ladite sonde, dans des conditions d'hybridation appropriées,  
35 et on met en évidence ou on quantifie une différence de potentiel ou une

variation de courant entre la sonde avant mise en contact et la sonde après mise en contact.

L'invention concerne également l'utilisation pour la détection d'un polynucléotide cible dans un échantillon biologique d'une sonde, utilisation selon laquelle on met en contact ladite sonde, dans des conditions d'hybridation appropriées, et on met en évidence ou on quantifie une différence de potentiel ou une variation de courant entre la sonde avant mise en contact et la sonde après mise en contact.

La présente invention a aussi pour objet une électrode dont tout ou partie de la surface est revêtue d'une sonde définie précédemment. Une telle électrode peut être obtenue par toute technique classique bien connue de l'homme du métier. A titre d'exemple, il peut être procédé à cette préparation en déposant un polypyrrole de l'invention à la surface d'une électrode de platine, d'or, de chrome ou de titane recouvert d'or, de carbone vitreux ou d'un oxyde conducteur tel que l'oxyde d'étain ou un oxyde mixte d'étain et d'indium.

L'invention concerne aussi l'utilisation d'un groupe électrodonneur pour augmenter l'électroactivité d'un polymère électroactif sur lequel est fixé un anti-ligand susceptible d'interagir avec un ligand, ledit groupe électrodonneur se trouvant sur le même monomère que l'anti-ligand.

Les différents objets de l'invention sont illustrés dans les exemples suivants qui font référence aux figures 1 à 15 annexées et desquels ressortiront leurs caractéristiques préférentielles et avantages.

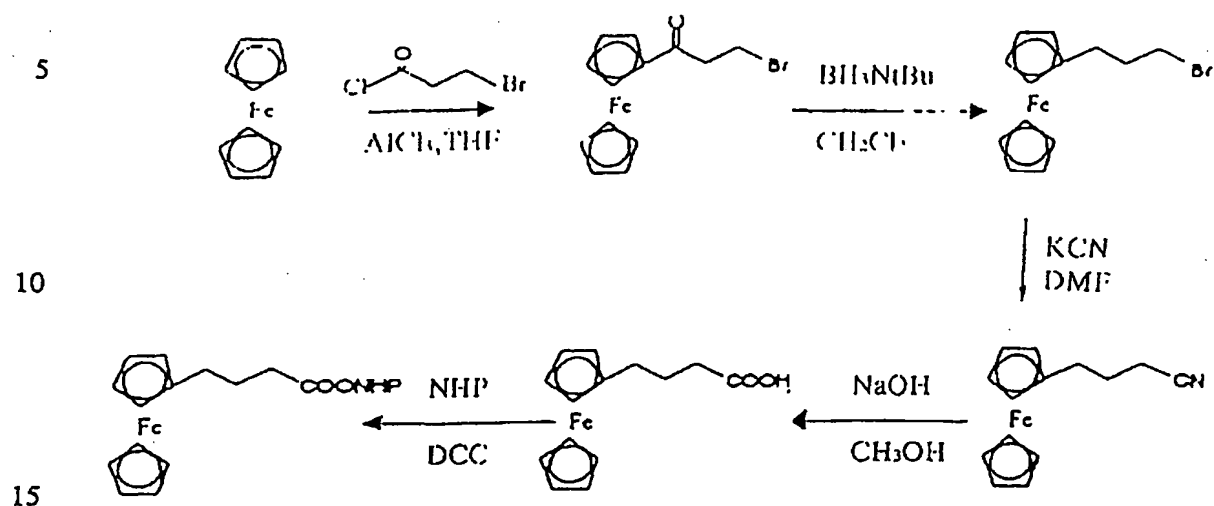
**Exemple 1 : Préparation d'un polypyrrole copolymère constitué de monomères de structure  $P-PN_{\text{sonde}}-Fe$  et de monomères substitués par le groupe  $-CH_2-COOH$**

L'élaboration de cette structure a nécessité la synthèse d'un ferrocène substitué par un groupe N-hydroxy-phthalimide (en abrégé NHP), et la fixation du polynucléotide sonde sur un polypyrrole, puis la fixation du ferrocène activé obtenu sur le polynucléotide sonde fixé sur le polypyrrole.

12

**1A-Obtention du ferrocène activé, le 1-ferrocène-propyl-NHP**

Le schéma de synthèse est le suivant :



L'analyse de la réponse électrochimique du 1-ferrocène-propyl-NHP ainsi obtenu met en évidence un système électrochimique réversible situé à un potentiel de 0,3 V/ECS. Cette réponse comparée à celle d'un ferrocène substitué directement par un groupe NHP

20

montre un gain en potentiel de l'ordre de 200mV.

**1B-Fixation du polynucléotide sonde sur le polypyrrole copolymère [PyCOOH,PyCONH-NHP]**

25

Cette étape est réalisée dans les mêmes conditions que celles décrites dans le document WO-A-95/29199, en utilisant un polynucléotide sonde fonctionnalisé sur ses extrémités 3' et 5' par des groupes aminés, l'un des groupes servant à la fixation sur le polymère polypyrrole activé et l'autre à la fixation sur le ferrocène activé.

**1C-Fixation du ferrocène sur le polypyrrole copolymère poly[PyCOOH,Py-PN<sub>sonde</sub>]**

30

Le greffage du PN<sub>sonde</sub> a été effectué en plongeant une électrode de poly[PyCOOH,Py-PN<sub>sonde</sub>] dans une solution contenant du 1-ferrocène-propyl-NHP obtenu en 1A, pendant 1 heure à température ambiante.

35

L'électrode est ensuite rincée et analysée électrochimiquement dans une solution de 0,5M NaCl.

La réponse représentée à la Figure 1 (en trait plein, Fe-(CH<sub>3</sub>)NHP, en trait pointillé, Fe-NHP) est caractérisée par un signal électrochimique apparu après greffage du PN<sub>sonde</sub> à un potentiel de 0,35 V/ECS en milieu aqueux caractéristique du ferrocène substitué sur le PN<sub>sonde</sub>. La mesure de la charge échangée au cours de l'oxydation montre la présence de sites de ferrocène électroactif. Cette mesure permet de déterminer la quantité totale de ferrocène fixé sur le PN<sub>sonde</sub>.

**Exemple 2 : Utilisation du polypyrrole obtenu à l'exemple 1 pour hybrider un polynucléotide cible (PN<sub>cible</sub>)**

L'hybridation est effectuée en plaçant l'électrode recouverte du polypyrrole obtenu à l'exemple 1, pendant 1 heure dans un tampon PEG en présence de 25 nmoles de PN<sub>cible</sub> à 37°C. L'électrode est ensuite rincée et analysée par voltamétrie cyclique.

La réponse électrochimique représentée par la figure 2 (en trait plein, avant hybridation, en trait pointillé, après hybridation) montre une forte diminution de l'électroactivité du signal du ferrocène après hybridation. Le courant diminue de 70  $\mu$ A. Cette forte diminution démontre la forte sensibilité du ferrocène à l'hybridation de PN<sub>cible</sub>.

Pour optimiser ce polypyrrole, il est nécessaire de définir un seul site de greffage sur le PN<sub>sonde</sub> pour contrôler la position et la quantité du ferrocène greffé, pour conduire à une parfaite reproductibilité des résultats. Cette optimisation fait l'objet de l'exemple 3.

**Exemple 3 : Préparation d'un polypyrrole copolymère constitué de monomères de structure P-Fe-PN<sub>sonde</sub>**

Cette préparation a consisté en la fonctionnalisation du polypyrrole par un ferrocène portant un groupe partant. Un PN<sub>sonde</sub> a été fixé d'une part sur l'homopolymère [PyNH-Fe-NHP] et d'autre part sur le copolymère [PyNH-Fe-NHP-PyCOOH].

Le PN<sub>sonde</sub> présente des propriétés de reconnaissance vis-à-vis d'un PN<sub>cible</sub> et on a vérifié si cette reconnaissance était conservée après

fixation du  $\text{PN}_{\text{sonde}}$  sur le ferrocène, puis on a recherché la nature de la réponse électrochimique du ferrocène à cette reconnaissance.

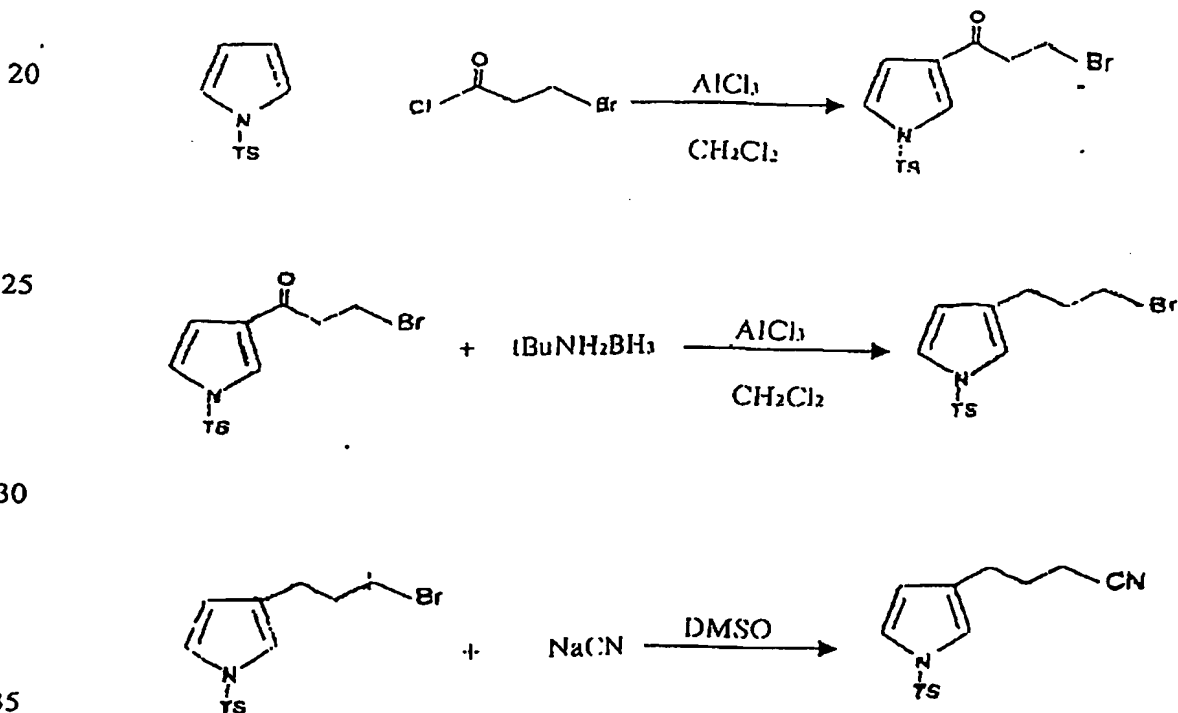
On a d'abord effectué la synthèse d'un monomère pyrrole substitué en position 3 par un ferrocène portant un groupe ester activé.

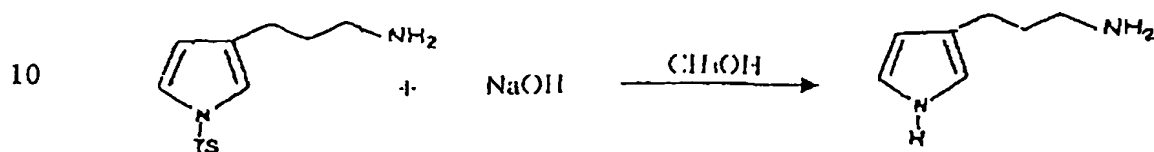
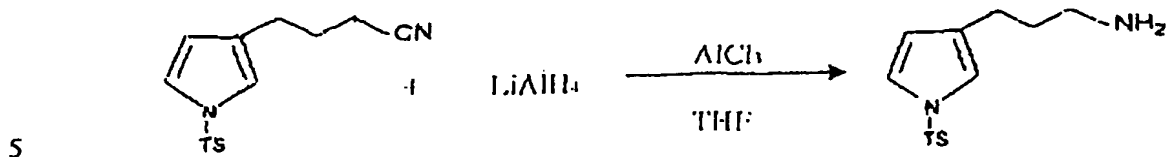
5 Puis, on a réalisé une polymérisation par voie électrochimique du monomère obtenu, et on a greffé le  $\text{PN}_{\text{sonde}}$  sur le polymère résultant.

### 3A-Synthèse du monomère, le 3-pyrrole-ferrocène-NHP

10 L'élaboration d'un pyrrole qui porte à la fois un ferrocène et un groupe NHP a nécessité plusieurs étapes de synthèse. La première est la synthèse de pyrrole substitué par un groupe butyle amine, soit le (4-aminobutyl)-3-pyrrole, la seconde est la synthèse de 1,1'-dipropanoate-N-hydroxyphtalamide-ferrocène, et la troisième étape est la synthèse du 3-pyrrole-ferrocène-NHP.

#### Synthèse du (4-aminobutyl)-3-pyrrole

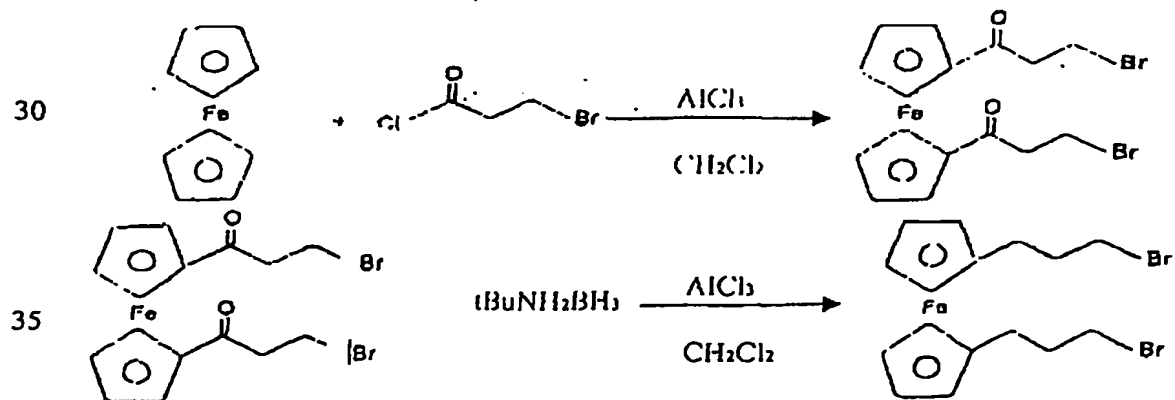


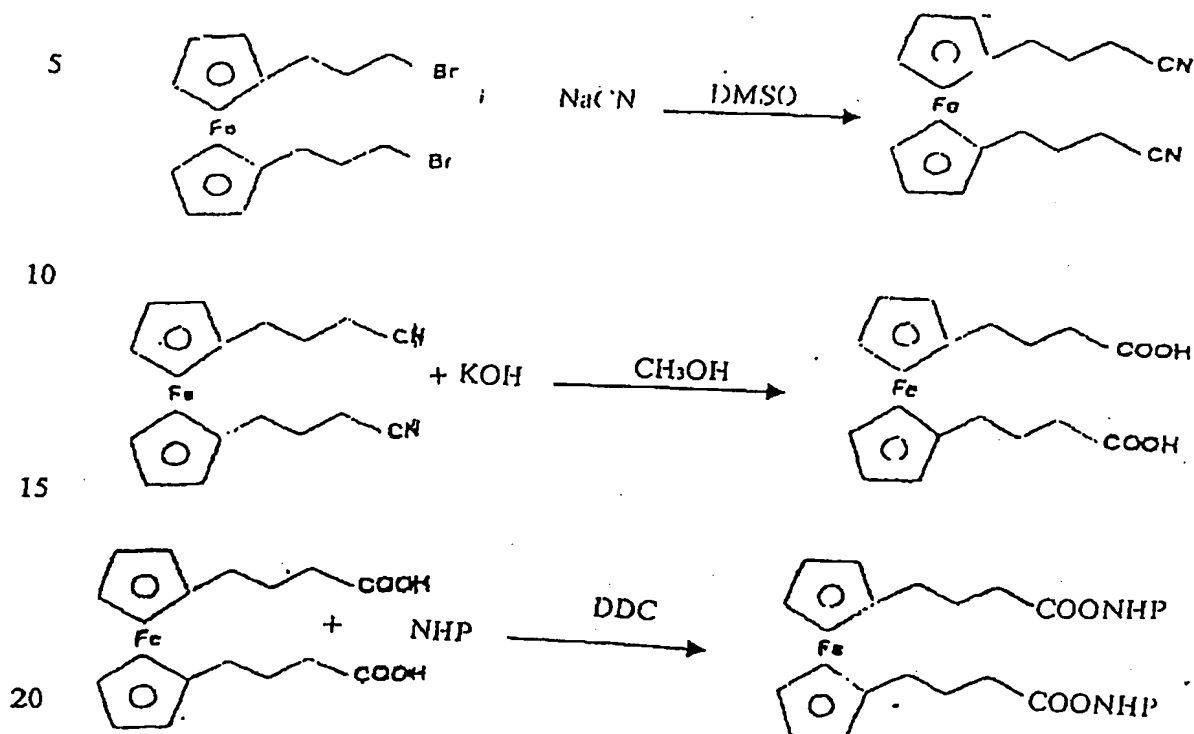


Le (4-amino butyle)-3-pyrrole dont la fonction amine permet la  
 15 fonctionnalisation du pyrrole par des groupes ester activé grâce aux  
 réactions de condensation est synthétisé. Pour synthétiser ce monomère,  
 on effectue une réaction d'acylation sur le pyrrole tosylo pour obtenir le  
 (3-bromo-propionyl)-3-tosyle-1-pyrrole avec un rendement de 63%. Cette  
 réaction est suivie d'une réduction de la fonction carbonyle. On obtient le  
 20 1-tosyle-pyrrole-3-bromopropyle avec un rendement de 78%. En utilisant le  
 cyanure de sodium, le brome est substitué par une fonction cyanure avec  
 un rendement de 50%. La transformation du cyanure en amine se fait par  
 réaction de réduction en utilisant l'hydruire d'aluminium et de lithium  
 (rendement 77%). L'hydrolyse du groupement tosylo par une base NaOH  
 25 conduit au (4-amino butyle)-3-pyrrole avec un rendement de 62%.

Synthèse du 1,1'-ferrocène propyl NHP

Le schéma de synthèse est le suivant :



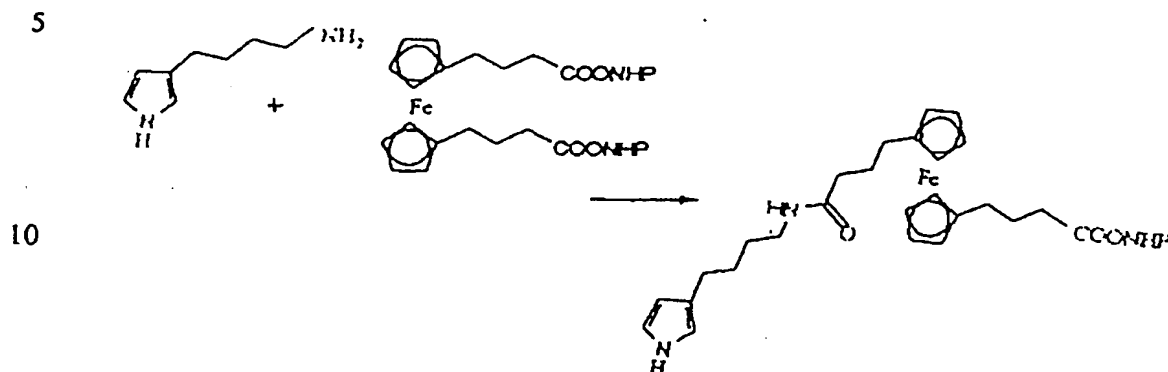


Ce ferrocène est obtenu par la transformation de 1,1'-ferrocène-propyl-cyano en 1,1'-ferrocène-propyl-acide en présence d'hydroxyde de sodium et de méthanol avec un rendement de 95%. Les groupements carboxyliques du ferrocène sont substitués par un groupe partant, le N-hydroxyphthalimide (NHP). Le ferrocène NHP est obtenu à partir du ferrocène acide, par estérification et en présence de DCC. Le DCC, joue un rôle de déshydratant, se transforme en DCU en captant ainsi l'eau formée au cours de la réaction.

17

## Synthèse du 3-pyrrole-ferrocène-NHP

Le schéma de synthèse est le suivant :



Le 3-pyrrole-ferrocène-NHP est obtenu par une réaction de couplage entre le 3-pyrrole-butylamine et le 1,1'-ferrocène-propyl-NHP dans l'acétonitrile, dans des conditions de large excès en ferrocène pour éviter une substitution du pyrrole sur les deux groupes NHP du ferrocène.

Caractérisation électrochimique du monomère

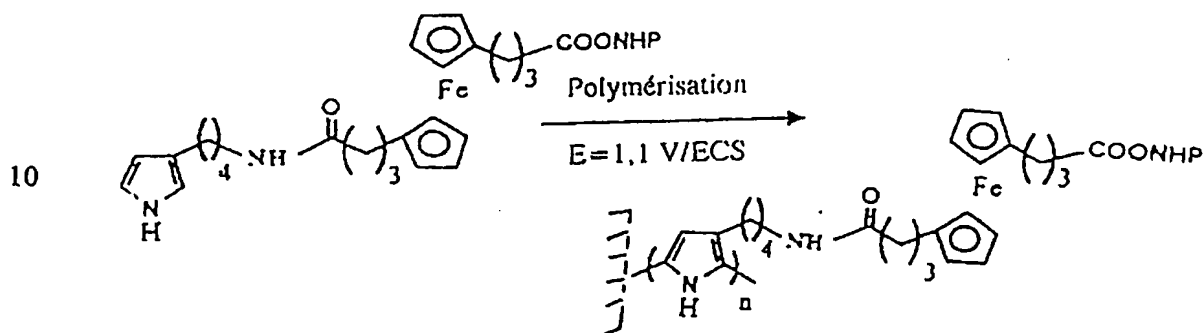
L'analyse électrochimique du monomère en solution est effectuée dans l'acétonitrile en présence d'électrolyte support 0,1M LiClO<sub>4</sub>.

La figure 3 montre le voltamogramme obtenu. Deux systèmes d'oxydoréduction sont observés. Le premier système présente des caractéristiques réversibles dont le potentiel d'oxydation est situé à 0,26 V. Ce système correspond à l'oxydoréduction du ferrocène substitué sur le pyrrole. Le deuxième système électrochimique est irréversible, son potentiel d'oxydation est situé à 1,17 V/ECS, il correspond à l'oxydation du pyrrole.

Ce potentiel d'oxydation du pyrrole substitué par le groupe ferrocène est élevé comparé au potentiel d'oxydation de pyrrole non substitué ou substitué avec le groupe carboxylique qui est généralement de l'ordre de 0,8 à 0,9 V/ECS.

### 3B-Préparation de l'homopolymère poly[Py-Fe-NHP]

Le schéma de polymérisation est le suivant :



Les films de poly[Py-Fe-NHP] sont obtenus en plongeant les électrodes de platine dans une solution du monomère poly[Py-Fe-NHP] en milieu acétonitrile qui contient 0,2M de tétrafluoroborate de tétrabutylammonium, ( $N^+Bu_4BF_4$ ). L'électropolymérisation est effectuée à un potentiel contrôlé de 1,1 V/ECS en se basant sur le potentiel d'oxydation du monomère. La charge déposée est de 70 MC.

Après polymérisation, il se forme un précité dans la solution qui est probablement dû à la formation des oligomères de courtes chaînes.

#### Caractérisation électrochimique de l'homopolymère poly[Py-Fe-NHP]

Les films obtenus d'homopolymère poly[Py-Fe-NHP,PyCOOH] sont analysés électrochimiquement dans un milieu acétonitrile en présence de 0,1M de  $LiClO_4$ . La figure 4, représente le voltamogramme obtenu. Ce voltamogramme montre une grande électroactivité du film de polymère. Le potentiel d'oxydation est de 288 mV/ECS et celui de la réduction est de 236 mV/ECS. La différence entre ces deux valeurs et le rapport des courants des pics d'oxydation (13,5  $\mu A$ ) et de réduction (11  $\mu A$ ) montrent que ce système électrochimique présente une bonne réversibilité. La charge échangée au cours de l'oxydation ou de la réduction est de 0,1 MC. Cette

valeur est très faible comparée à la charge déposée au cours de la polymérisation. A partir de la charge d'oxydation, on peut déterminer la quantité de ferrocène électroactive déposée sur l'électrode. Sachant que le ferrocène échange un électron au cours de son processus d'oxydation, on

5 peut établir la loi de Faraday :

$$Q_{ox} = N(Fe) * F$$

Le nombre de moles de ferrocène ou d'unités pyrrole électroactives sur l'électrode est de  $10^{-9}$  moles.

10 Le calcul du nombre de mole de ferrocène à partir de la charge de polymérisation montre des valeurs très élevées de l'ordre de  $10^{-7}$  moles.

*Cependant, ces résultats montrent que le rendement de polymérisation est très faible. Deux facteurs sont à l'origine de ce faible rendement, d'une part, une partie de la charge de polymérisation sert à l'oxydation du ferrocène en solution et d'autre part, l'encombrement*  
 15 *stérique du groupement ferrocène-NHP substitué sur le pyrrole empêche le couplage entre ces deux unités pyrrole et conduit à des oligomères de courtes chaînes qui précipitent en solution.*

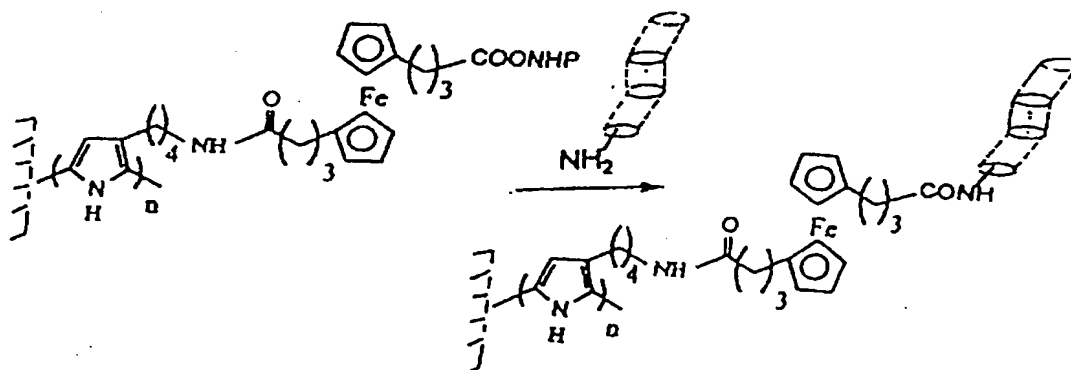
### 3C-Fixation du $PN_{sonde}$ sur l'homopolymère

20 -

Le schéma de fixation est le suivant :

25

30



35

Le  $PN_{\text{sonde}}$  utilisé est un polynucléotide de 25 paires de bases ayant la séquence suivante identifiée par SEQ ID NO :1 :

5' TCA-ATC-TCG-GGA-ATC-TCA-ATG-TTA-G<sup>3'</sup>.

La fixation du  $PN_{\text{sonde}}$  est effectuée sur l'homopolymère précurseur poly[Py-Fe-NHP]. Les conditions chimiques de cette substitution sont similaires à celles de la fixation sur le polymère poly[PyCCNH-NHP]

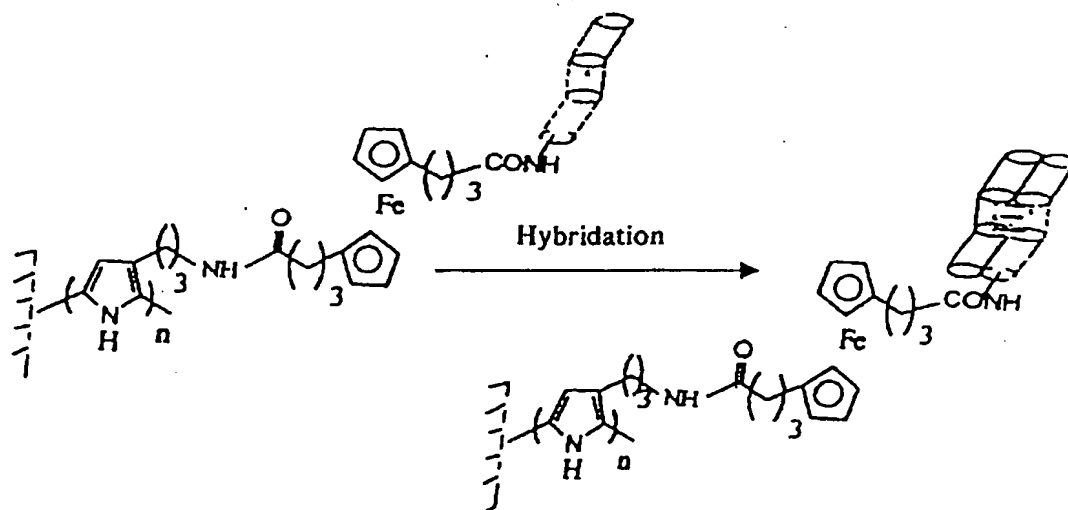
Le couplage entre le pyrrole Fe-NHP et le  $PN_{\text{sonde}}$  portant le groupe amine dans sa position 5' est effectué en plongeant l'électrode dans une solution d'acétonitrile en présence de 10% d'un tampon acétate et de 25  $\mu\text{mole/l}$ . La réaction se déroule à température ambiante pendant 2 heures.

Les films obtenus sont analysés par voltamétrie cyclique dans l'eau en présence de 0,5M NaCl. La figure 5 montre un système d'oxydoréduction dont les pics d'oxydation et de réduction sont situés respectivement à 273 mV et 258 mV.

Le système électrochimique du ferrocène en milieu aqueux n'est pas aussi réversible comparé à l'analyse du film dans l'acétonitrile. Cette perte de l'électroactivité est probablement liée à des problèmes de solvation soit de l'ion dopant ou de la matrice de polymère dans l'eau.

**Exemple 4 : Hybridation du  $PN_{\text{cible}}$  sur l'homopolymère poly[Py-Fe- $PN_{\text{sonde}}$ ] obtenu à l'exemple 3**

Le schéma d'hybridation est le suivant :



Des films de copolymère poly[Py-Fe-PN<sub>sonde</sub>] ont été mis en incubation en présence de 25 nmoles (25  $\mu$ mol/l) de PN<sub>cible</sub> dans un tampon biologique, pendant 3 heures, à une température de 37°C, dans un volume de 1 ml.

- 5 Le PN<sub>cible</sub> comporte 25 bases complémentaires des bases du PN<sub>sonde</sub> et répond à la séquence suivante, identifiée par SEQ ID NO :2 :

5'-CTA-ACA-TTG-AGA-TTC-CCG-AGA-TTG-A-3'.

- Un test de blanc est effectué en incubant une autre électrode dans le tampon d'hybridation qui contient de l'ADN de saumon pour  
10 déterminer les effets des interactions non spécifiques.

#### Caractérisation électrochimique

La réponse électrochimique des polymères a été analysée par voltamétrie cyclique en milieux aqueux en présence de 0,5M NaCl.

- 15 De l'électrode en blanc

Le voltamogramme apparaissant à la figure 6 (en trait plein, avant hybridation, en trait pointillé, après hybridation) montre la réponse électrochimique de l'électrode de référence incubée en présence de tampon PEG.

- 20 On observe que l'électrode qui sert de référence montre une variation du potentiel d'oxydation et une diminution de l'électroactivité. Ceci indique que les interactions non spécifiques ont un léger effet sur la réponse électrochimique du ferrocène.

#### Du polymère testé après hybridation

- 25 L'analyse électrochimique de l'électrode incubée en présence du PN<sub>cible</sub> en milieux aqueux est représentée sur la figure 7 (en trait plein : avant hybridation, en trait pointillé : après hybridation).

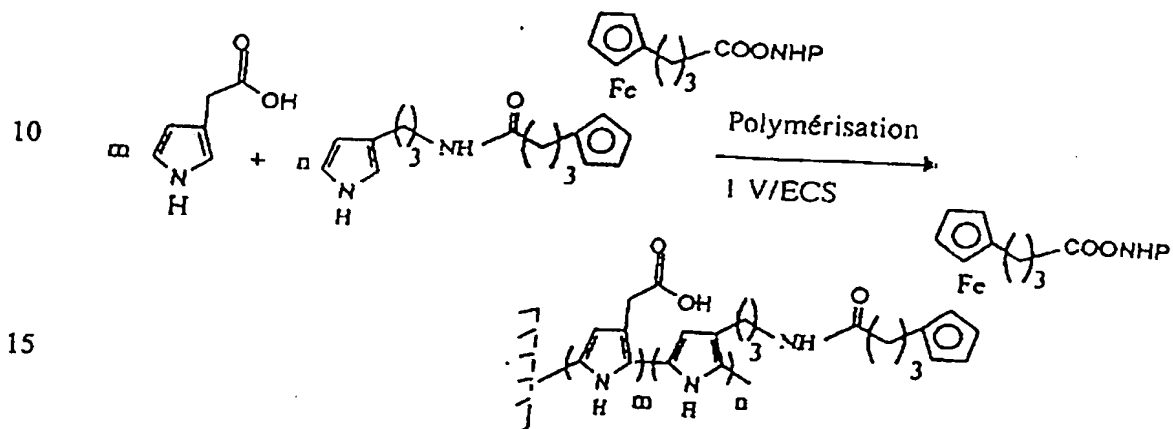
- L'électrode après incubation montre un déplacement du potentiel d'oxydation vers les potentiels élevés et une diminution de  
30 l'électroactivité. La charge échangée au cours de l'oxydation est de la réduction diminue également.

On observe que la variation de la réponse électrochimique du ferrocène est plus importante comparée à l'électrode de blanc.

**Exemple 5 : Préparation d'un polypyrrole copolymère constitué de monomères de structure P-Fe-NHP et de monomères substitués par le groupe  $-\text{CH}_2-\text{COOH}$**

**5A-Préparation du polymère poly[Py-Fe-NHP,PyCOOH]**

Le schéma de synthèse est le suivant :



La copolymérisation entre le 3-pyrrole-acide acétique (PyCOOH) et le 3-pyrrole-Fe-NHP (Py-Fe-NHP) permet de diluer ce monomère encombrant dans la matrice de polymère afin de minimiser les perturbations d'origines stériques. En plus la copolymérisation avec le 3-pyrrole-acide acétique permet d'augmenter la porosité des films.

Le choix de concentrations respectives de monomères PyCOOH et Py-Fe-NHP est déterminé en se référant aux potentiels de polymérisation de ces deux monomères. Le PyCOOH s'oxyde à 0,9 V/ECS, le Py-Fe-NHP s'oxyde à 1,1 V/ECS. Il est nécessaire de prendre une faible concentration de PyCOOH par rapport au Py-Fe-NHP. Les concentrations de ces deux monomères utilisées pour l'électropolymérisation du copolymère sont donc 0,02 M pour le PyCOOH et 0,08 M pour le Py-Fe-NHP.

Le copolymère a été déposé à potentiel imposé de 1,1 V/ECS sur une électrode de platine de surface de 700 cm<sup>2</sup> en milieu propylène carbonate en présence de 0,2 M de LiCl<sub>2</sub>. La charge déposée au cours de l'électropolymérisation est de 35 MC. Il est difficile de déterminer l'épaisseur du film à partir de la charge de polymérisation. Puisqu'une partie

de la charge mesurée au cours de l'électropolymérisation a servi à l'oxydation du ferrocène en solution.

5 Caractérisation électrochimique du polymère poly[Py-Fe-NHP,PyCOOH] obtenu

Cette caractérisation a été effectuée en milieu acétonitrile en présence de 0,1 M  $\text{LiClO}_4$ . Le voltamogramme en figure 8, montre un système électrochimique réversible avec un pic d'oxydation situé à un potentiel de 254 mV et un pic de réduction symétrique situé à un potentiel de 234 mV. La largeur à mi-hauteur est de 150 mV. Cette réponse électrochimique présente le signal du ferrocène et montre une électroactivité importante de cette sonde électrochimique. Le transfert électronique à travers la chaîne conjuguée du polymère est très important, ce qui montre que le polypyrrole est conducteur. La charge échangée au cours de l'oxydation du ferrocène est de l'ordre de 0,15 mC. Cette charge d'oxydation du ferrocène permet de calculer le nombre de moles de pyrroles portant le groupe ferrocène dans le polymère en supposant que tous les sites ferrocène sont électroactifs.

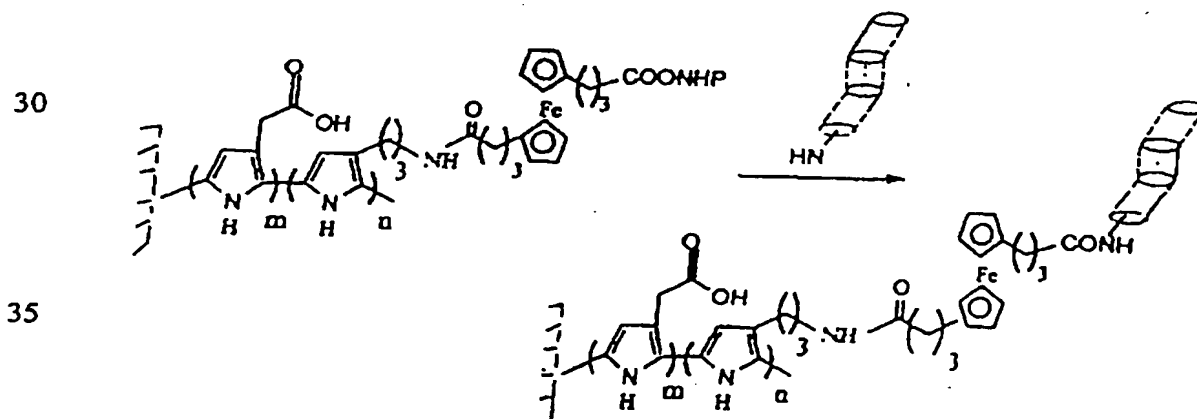
A partir de la loi de Faraday on a :

20  $Q_{\text{ox}} = N \cdot F$  avec N le nombre de mole de ferrocène et F la constante de Faraday.

Le nombre de mole de ferrocène électroactive est de l'ordre de  $10^{-9}$  mole.

25 **5B-Fixation du polynucléotide sonde sur le polypyrrole copolymère poly[Py-Fe-NHP,PyCOOH]**

Le schéma de fixation est le suivant :



Le  $\text{PN}_{\text{sonde}}$  utilisé est le polynucléotide SEQ ID NO :1.

La fixation du  $\text{PN}_{\text{sonde}}$  (25  $\mu\text{moles/l}$ ) est effectuée sur le copolymère précurseur poly[Py-Fe-NHP,PyCOOH] en plongeant l'électrode dans une solution d'acétonitrile en présence de 10% de tampon acétate.

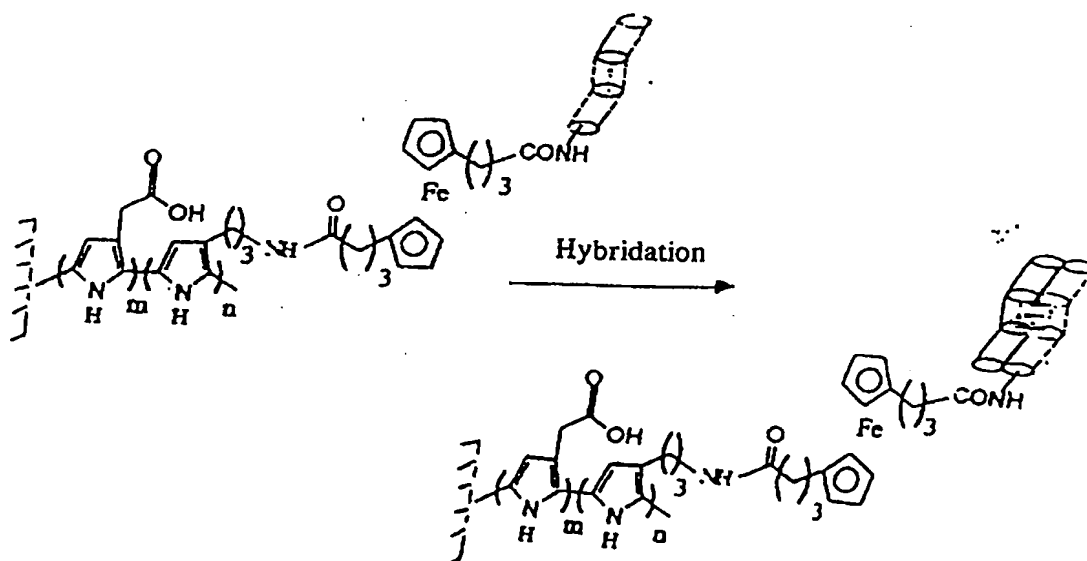
#### Caractérisation électrochimique du polymère poly[Py-Fe- $\text{PN}_{\text{sonde}}$ ,PyCOOH] obtenu

La figure 9 montre la réponse électrochimique de l'électrode après greffage du  $\text{PN}_{\text{sonde}}$  en milieux aqueux en présence de 0,5 M NaCl. Le voltamogramme présente un système d'oxydoréduction caractérisé par un pic d'oxydation intense et fin et un pic de réduction large.

Les potentiels des pics d'oxydation et de réduction sont respectivement de 341 mV et 275 mV, la largeur à mi-hauteur est de 100 mV pour le pic d'oxydation et de 200 mV pour le pic de réduction. La charge échangée au cours de l'oxydation ou de la réduction est de l'ordre de 0,1 mC.

#### Exemple 6 : Hybridation du PNCible sur le copolymère poly[Py-Fe- $\text{PN}_{\text{sonde}}$ ,PyCOOH] obtenu à l'exemple 5

Le schéma d'hybridation est le suivant :



Des films de copolymère poly[Py-Fe-PN<sub>sonde</sub>, PyCOOH] ont été mis en incubation en présence de PN<sub>cible</sub> de 25 bases dans les mêmes conditions que précédemment.

Une électrode de référence est incubée dans le même tampon  
5 biologique sans PN<sub>cible</sub>.

#### Caractérisation électrochimique

La réponse électrochimique des électrodes incubées en présence de la cible et de la non-cible a été analysée en milieu acétonitrile et en  
10 milieux aqueux.

#### De l'électrode en blanc

Les figures 10 et 11 représentent les voltamogrammes avant (en trait plein) et après (en trait pointillé) hybridation en présence de la non-cible (ADN de saumon) en milieu acétonitrile et en milieu aqueux.

15 On observe qu'en milieu acétonitrile, la réponse électrochimique du ferrocène montre une stabilité du potentiel d'oxydation avec une très légère variation des courants de pics.

L'analyse de la réponse électrochimique de l'électrode de référence en milieu aqueux en présence de 0,5 M NaCl montre une  
20 variation de la réponse électrochimique du ferrocène. Une augmentation du potentiel d'oxydation et une diminution du courant des pics.

#### Du copolymère testé après hybridation

L'analyse électrochimique de l'électrode incubée en présence de la cible en milieux aqueux est représentée sur la figure 12 (en trait plein :  
25 avant hybridation, en trait pointillé : après hybridation). Le voltamogramme montre une forte variation du signal électrochimique après hybridation. Le potentiel d'oxydation se déplace vers les potentiels les plus élevés ; il passe de 340 mV à 387 mV après hybridation. Le courant d'oxydation diminue de 60%. La charge échangée au cours de l'oxydation diminue de 25%.

30 L'analyse de la réponse électrochimique dans l'acétonitrile de l'électrode incubée en présence de 0,1 nmole de PN<sub>cible</sub> est représentée sur la figure 13 (en trait plein : avant hybridation, en trait pointillé : après hybridation). Le voltamogramme après incubation montre la sauvegarde du système réversible du ferrocène en milieu organique. Le potentiel  
35 d'oxydation et de réduction du ferrocène se déplace vers les bas potentiels.

Cette variation de la réponse électrochimique en milieu aqueux et en milieu organique permet de montrer qu'il existe une hybridation sélective et spécifique entre le  $PN_{sonde}$  greffé sur le ferrocène et le  $PN_{cible}$ .

5 Bien que ces électrodes incubées en présence de la cible aient montré des variations significatives de la réponse électrochimique, il est nécessaire de déterminer l'origine de la variation de la réponse du ferrocène après incubation dans un tampon biologique sans la cible.

#### 10 Exemple 6 : Influence de la charge de polymérisation sur l'électroactivité

L'influence de la charge déposée au cours de la polymérisation sur la variation du signal électrochimique du poly[py-Fe- $PN_{sonde}$ ,PyCOOH] de l'exemple 5 a été étudiée pour trois valeurs de charges 5, 10 et 15 mC.

15 La figure 14 démontre que le courant d'oxydation diminue avec la quantité de la charge déposée.

#### Exemple 7 : Reproductibilité électrochimique des électrodes

20 La reproductibilité électrochimique du poly[Py-Fe- $PN_{sonde}$ ,PyCOOH] de l'exemple 5 a été testée sur six électrodes de films de faible épaisseur.

La caractérisation électrochimique de ces électrodes réalisée en milieu acétonitrile en présence de 0,1 M  $LiClO_4$ , est illustrée à la figure 15  
25 qui montre qu'on obtient sensiblement les mêmes voltamogrammes, après greffage du  $PN_{sonde}$  pour les six électrodes.

#### Exemple 8 : Influence des conditions d'hybridation du $PN_{cible}$ sur le $PN_{sonde}$

30

##### 8A-Effet du tampon d'hybridation

La même électrode poly[Py-Fe- $PN_{sonde}$ ,PyCOOH] ( $Q = 5$  mC) de l'exemple 5 a été incubée dans deux tampons différents :

- 35 - Tampon TE-NaCl à 37°C pendant 2 heures et 3 heures,
- Tampon SSPEG à 37°C pendant 2 heures et 3 heures.

La caractérisation électrochimique (voltamogrammes non représentés) effectuée en milieu acétonitrile en présence de 0,1 M LiClO<sub>4</sub> respectivement, avant et après l'incubation pour chacun des tampons ci-dessus met en évidence l'intérêt du tampon SSPEG dans lequel l'électrode est plus stable.

#### 8B-Effet de la concentration du PN<sub>cible</sub>

Plusieurs films de poly[Py-Fe-PN<sub>sonde</sub>,PyCOOH] de l'exemple 5 ont été incubés dans un tampon SSPEG, en présence de différentes concentrations de PN<sub>cible</sub> (0,01, 0,05 et 0,5 nmoles/l)

La caractérisation électrochimique (voltamogrammes non représentés) effectuée en milieu acétonitrile en présence de 0,1 M LiClO<sub>4</sub> respectivement, avant et après hybridation en présence des différentes concentrations ci-dessus, montre que la variation de la réponse électrochimique avant et après hybridation, augmente avec la concentration du PN<sub>cible</sub>. On observe en effet qu'au potentiel de 280 mV/ECS qui correspond au potentiel du pic initial, la diminution du courant varie avec la concentration du PN<sub>cible</sub>.

## REVENDICATIONS

1. Complexe électroactif, constitué par un polymère homopolymère ou copolymère électroactif d'au moins deux monomères, un anti-ligand et un ligand ayant spécifiquement interagi avec ledit anti-ligand, caractérisé en ce que ledit anti-ligand est lié directement ou indirectement, au polymère électroactif, et qu'il comprend en outre au moins un groupe électrodonneur lié directement ou indirectement, à l'anti-ligand.

2. Complexe selon la revendication 1, caractérisé en ce que le polymère électroactif est choisi parmi le polypyrrole, le polyacétylène, la polyazine, le poly(p-phénylène), le poly(p-phénylène vinylène), le polypyrène, le polythiophène, le polyfuranne, le polysélenophène, la polypyridazine, le polycarbazole, la polyaniline, les polynucléotides bicaténares.

3. Complexe selon la revendication 1, caractérisé en ce que le groupe électrodonneur est choisi parmi le ferrocène, la quinone et les dérivés de ceux-ci.

4. Complexe selon la revendication 1, caractérisé en ce que le ligand et l'anti-ligand sont des molécules biologiques notamment choisies parmi les polynucléotides et les polypeptides.

5. Complexe selon la revendication 4, caractérisé en ce que le ligand et/ou l'anti-ligand sont marqués par un traceur susceptible de générer directement ou indirectement un signal.

6. Complexe selon la revendication 1, caractérisé en ce que le groupement électrodonneur est lié, directement ou indirectement, au ligand ayant interagi avec l'anti-ligand, ledit anti-ligand étant lié, directement ou indirectement, au polymère électroactif.

7. Complexe selon la revendication 6, caractérisé en ce que l'anti-ligand ou le ligand sont liés de manière covalente au groupement électrodonneur, par l'intermédiaire d'un second groupe de liaison.

8. Complexe selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'anti-ligand ou le ligand sont liés de manière covalente au polymère électroactif, par l'intermédiaire d'un troisième groupe de liaison.

9. Complexe selon l'une quelconque des revendications 7 à 8, caractérisé en ce que les premier et/ou second et/ou troisième groupes de liaison relient respectivement, le groupe électrodonneur à l'anti-ligand et

l'anti-ligand au polymère électroactif, par l'intermédiaire d'un bras de couplage.

10. Complexe selon la revendication 6, caractérisé en ce que le groupe électrodonneur est lié au ligand, par l'intermédiaire d'un support  
5 inerte ou biologique.

11. Complexe selon la revendication 10 caractérisé en ce que le support inerte est une bille de polystyrène, une bille magnétique ou une bille de verre.

12. Complexe selon la revendication 10, caractérisé en ce que  
10 le support biologique est une cellule, dans laquelle le groupe électrodonneur a été internalisé.

13. Complexe selon la revendication 1, caractérisé en ce que le polymère électroactif est un polypyrrole constitué d'au moins deux monomères consistant chacun en un noyau pyrrole, et en ce que le groupe  
15 électrodonneur est le ferrocène.

14. Complexe selon la revendication 13, caractérisé en ce que l'anti-ligand est un polynucléotide sonde et le ligand est un polynucléotide cible, au moins partiellement hybridé audit anti-ligand.

15. Complexe selon la revendication 14, caractérisé en ce que  
20 le polynucléotide sonde est lié au ferrocène et au noyau pyrrole dudit monomère au moins.

16. Complexe selon la revendication 13, caractérisé en ce que le noyau pyrrole est substitué sur le carbone en position 3.

17. Complexe selon la revendication 15, caractérisé en ce que  
25 le polynucléotide sonde est fixé sur le carbone en position 1 d'un des noyaux cyclopentadiène du ferrocène.

18. Complexe selon la revendication 13, caractérisé en ce que le polypyrrole est un copolymère et comprend un monomère dont le noyau pyrrole est substitué par un groupe  $-\text{CH}_2-\text{COOH}$  ou  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$ .

19. Complexe selon la revendication 15, caractérisé en ce que  
30 le second groupe de liaison, entre le ferrocène et le polynucléotide sonde ou le polynucléotide cible est le groupe  $-\text{CO}-$ .

20. Complexe selon la revendication 15, caractérisé en ce que le troisième groupe de liaison entre le polynucléotide sonde ou le  
35 polynucléotide cible et le noyau pyrrole, est le groupe  $-\text{CH}_2-\text{CO}-$ .

21. Complexe selon l'une quelconque des revendications 19 à 20, caractérisé en ce que les premier et/ou second et/ou troisième groupes de liaison relie, indirectement, le ferrocène au polynucléotide sonde ou au polynucléotide cible et le noyau pyrrole au polynucléotide sonde ou au polynucléotide cible, par l'intermédiaire d'un bras de couplage.

22. Complexe selon la revendication 21, caractérisé en ce que le bras de couplage est une chaîne hydrocarbonée saturée ayant au moins deux atomes de carbone, de préférence au moins 2 ou 3 atomes de carbone.

23. Complexe selon l'une quelconque des revendications 14 à 22, caractérisé en ce que le polynucléotide sonde ou le polynucléotide cible est fixé au ferrocène et/ou au noyau pyrrole du monomère au moins, par l'intermédiaire respectivement du second et/ou du troisième groupes de liaison et d'au moins une des fonctions aminées du polynucléotide sonde ou du polynucléotide cible.

24. Sonde électroactive, constituée par un polymère homopolymère ou copolymère électroactif d'au moins deux monomères, un anti-ligand et un ligand ayant spécifiquement interagi avec ledit anti-ligand, caractérisé en ce que ledit anti-ligand est lié directement ou indirectement, au polymère électroactif, et qu'il comprend en outre au moins un groupe électrodonneur lié directement ou indirectement, à l'anti-ligand.

25. Sonde selon la revendication 24, caractérisée en ce que le polymère électroactif est choisi parmi le polypyrrole, le polyacétylène, la polyazine, le poly(p-phénylène), le poly(p-phénylène vinylène), le polypyrène, le polythiophène, le polyfuranne, le polysélénophène, la polypyridazine, le polycarbazole, la polyaniline, les polynucléotides bicaténaires.

26. Sonde selon la revendication 24, caractérisée en ce que le groupe électrodonneur est choisi parmi le ferrocène, la quinone et les dérivés de ceux-ci.

27. Sonde selon la revendication 24, caractérisée en ce que le ligand est une molécule biologique notamment choisie parmi les polynucléotides et les polypeptides.

28. Sonde selon la revendication 27, caractérisée en ce que le ligand est marqué par un traceur susceptible de générer directement ou indirectement un signal.

29. Sonde selon la revendication 24, caractérisée en ce que l'anti-ligand est lié de manière covalente au groupement électrodonneur, par l'intermédiaire d'un second groupe de liaison.

5 30. Sonde selon la revendication 24, caractérisée en ce que l'anti-ligand est lié de manière covalente au polymère électroactif, par l'intermédiaire d'un troisième groupe de liaison.

31. Sonde selon l'une quelconque des revendications 37 à 39, caractérisée en ce que les premier et/ou second et/ou troisième groupes de liaison relient respectivement, le groupe électrodonneur à l'anti-ligand et  
10 l'anti-ligand au polymère électroactif, par l'intermédiaire d'un bras de couplage.

32. Sonde selon les revendications 25 et 26, caractérisée en ce que le polymère électroactif est le polypyrrole constitué d'au moins deux monomères consistant chacun en un noyau pyrrole, et en ce que le groupe  
15 électrodonneur est le ferrocène.

33. Sonde selon les revendications 24 et 32, caractérisée en ce que l'anti-ligand est un polynucléotide sonde, susceptible d'hybrider un polynucléotide cible, dans des conditions d'hybridation appropriées.

34. Sonde selon la revendication 33, caractérisée en ce que le  
20 polynucléotide sonde est lié au ferrocène et au noyau pyrrole dudit monomère au moins.

35. Sonde selon la revendication 32, caractérisée en ce que le noyau pyrrole est substitué sur le carbone en position 3.

36. Sonde selon la revendication 34, caractérisée en ce que le  
25 polynucléotide sonde est lié sur le carbone en position 1 d'un des noyaux cyclopentadiène du ferrocène.

37. Sonde selon la revendication 32, caractérisée en ce que le polypyrrole est un copolymère et comprend un monomère dont le noyau pyrrole est substitué par un groupe  $-\text{CH}_2-\text{COOH}$  ou  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$ .

30 38. Sonde selon la revendication 34, caractérisée en ce que le second groupe de liaison, entre le ferrocène et le polynucléotide sonde est le groupe  $-\text{CO}-$ .

39. Sonde selon la revendication 34, caractérisée en ce que le  
35 troisième groupe de liaison entre le polynucléotide sonde et le noyau pyrrole, est le groupe  $-\text{CH}_2-\text{CO}-$ .

40. Sonde selon l'une quelconque des revendications 38 à 39, caractérisée en ce que les premier et/ou second et/ou troisième groupes de liaison relient, indirectement, respectivement, le ferrocène au polynucléotide sonde et le noyau pyrrole au polynucléotide sonde, par l'intermédiaire d'un bras de couplage.

41. Sonde selon la revendication 40, caractérisée en ce que le bras de couplage est une chaîne hydrocarbonée saturée ayant au moins deux atomes de carbone, de préférence au moins 2 ou 3 atomes de carbone.

42. Sonde selon l'une quelconque des revendications 32 à 41, caractérisée en ce que le polynucléotide sonde est fixé au ferrocène et/ou au noyau pyrrole du monomère au moins, par l'intermédiaire respectivement du second et/ou du troisième groupe de liaison et d'au moins une des fonctions aminées du polynucléotide sonde.

43. Procédé pour préparer une sonde selon la revendication 31, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

(a) On dispose d'un polypyrrole homopolymère ou copolymère constitué par au moins deux monomères consistant chacun en un noyau pyrrole, dont au moins un est substitué sur le carbone en position 3 par un polynucléotide sonde,

(b) On obtient le ferrocène comportant sur le carbone en position 1 d'un des noyaux cyclopentadiène, au moins un groupe activé ou activable, et

(c) On met en contact le polypyrrole homopolymère ou copolymère, substitué par un polynucléotide sonde, avec le ferrocène comportant ledit groupe activé ou activable.

44. Procédé selon la revendication 43, caractérisé en ce que le ou les groupes activés ou activables du ferrocène, identiques ou différents, sont un groupe ester activé ou activable, et de préférence le groupe -CO-[N-hydroxy-phtalimide].

45. Procédé selon l'une quelconque des revendications 43 ou 44, caractérisé en ce que le ou les groupes activés ou activables du ferrocène, sont fixés sur celui-ci par l'intermédiaire d'un bras de couplage.

46. Procédé de détection d'un ligand dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'on met en contact une sonde selon l'une quelconque des revendications 24 à 42, dans des conditions de réaction

appropriées pour l'interaction spécifique anti-ligand / ligand, et en ce qu'on met en évidence ou on quantifie une différence de potentiel ou une variation de courant entre la sonde avant mise en contact et la sonde après mise en contact.

5           47. Procédé selon la revendication 46, caractérisée en ce que le ligand est un polynucléotide.

48. Electrode dont tout ou partie de la surface est revêtue d'une sonde selon l'une quelconque des revendications 24 à 42.

10           49. Utilisation d'un groupe électrodonneur pour augmenter l'électroactivité d'un polymère électroactif sur lequel est fixé un anti-ligand susceptible d'interagir avec un ligand, ledit groupe électrodonneur se trouvant sur le même monomère que l'anti-ligand.

15           47. Procédé de détection d'un ligand dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'on met en contact une sonde électroactive, constituée par un polymère homopolymère ou copolymère, électroactif, d'au moins deux monomères, un anti-ligand susceptible d'interagir spécifiquement avec un ligand, ladite sonde comprenant en outre au moins un groupement électrodonneur lié, directement ou indirectement, d'une part au polymère électroactif et d'autre part à l'anti-ligand, dans des  
20 conditions de réaction appropriées pour l'interaction spécifique anti-ligand / ligand, et en ce qu'on met en évidence ou on quantifie une différence de potentiel ou une variation de courant entre la sonde avant mise en contact et la sonde après mise en contact..

25           48. Procédé selon la revendication 47 caractérisé en ce que le polymère électroactif est choisi parmi le polypyrrole, le polyacétyle, la polyazine, le poly(p-phénylène), le poly(p-phénylène vinylène), le polypyrène, le polythiophène, le polyfuranne, le polysélenophène, la polypyridazine, le polycarbazole, la polyaniline, les polynucléotides bicaténaires.

30           49. Procédé selon la revendication 47 caractérisé en ce que le groupe électrodonneur est choisi parmi le ferrocène, la quinone et les dérivés de ceux-ci.

35           50. Procédé selon la revendication 47 caractérisé en ce que le ligand est une molécule biologique notamment choisie parmi les polynucléotides et les polypeptides.

51. Procédé selon la revendication 47 caractérisé en ce que le ligand est marqué par un traceur susceptible de générer directement ou indirectement un signal.

5 52. Procédé selon la revendication 47 caractérisé en ce que le groupement électrodonneur est lié, directement ou indirectement, d'une part au polymère électroactif et d'autre part à l'anti-ligand.

53. Procédé selon la revendication 47 caractérisé en ce que le groupement électrodonneur est lié de manière covalente au polymère électroactif, par l'intermédiaire d'un premier groupe de liaison.

10 54. Procédé selon la revendication 47 caractérisé en ce que l'anti-ligand est lié de manière covalente au groupement électrodonneur, par l'intermédiaire d'un second groupe de liaison.

15 55. Procédé selon l'une quelconque des revendications 52 à 54 caractérisé en ce que les premier et/ou second et/ou troisième groupes de liaison relient respectivement, le groupe électrodonneur au polymère électroactif, le groupe électrodonneur à l'anti-ligand, par l'intermédiaire d'un bras de couplage.

20 56. Procédé selon les revendications 49 et 50 caractérisé en ce que le polymère électroactif est le polypyrrole constitué d'au moins deux monomères consistant chacun en un noyau pyrrole, et en ce que le groupe électrodonneur est le ferrocène.

57. Procédé selon les revendications 47 et 56, caractérisé en ce que l'anti-ligand est un polynucléotide sonde, susceptible d'hybrider un polynucléotide cible, dans des conditions d'hybridation appropriées.

25 58. Procédé selon la revendication 47 caractérisé en ce que le ferrocène est lié d'une part au polynucléotide sonde et d'autre part sur le noyau pyrrole d'un monomère du polypyrrole.

59. Procédé selon la revendication 56 caractérisé en ce que le noyau pyrrole est substitué sur le carbone en position 3.

30 60. Procédé selon la revendication 58 caractérisé en ce que le polynucléotide sonde est lié sur le carbone en position 1 d'un des noyaux cyclopentadiène du ferrocène.

35 61. Procédé selon la revendication 58 caractérisé en ce que le polynucléotide sonde est fixé sur le carbone en position 1 d'un des noyaux cyclopentadiène du ferrocène, et le ferrocène est fixé sur le noyau pyrrole

par l'intermédiaire du carbone en position 1' de l'autre noyau du cyclopentadiène.

5 62. Procédé selon la revendication 56, caractérisé en ce que le polypyrrole est un copolymère et comprend un monomère dont le noyau pyrrole est substitué par un groupe  $-\text{CH}_2\text{-COOH}$  ou  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{OH}$ .

63. Procédé selon la revendication 55 caractérisé en ce que le premier groupe de liaison entre le ferrocène et le noyau pyrrole, est le groupe  $-\text{CONH-CH}_2-$ .

10 64. Procédé selon la revendication 55 caractérisé en ce que le second groupe de liaison, entre le ferrocène et le polynucléotide sonde est le groupe  $-\text{CO}-$ .

15 65. Procédé selon l'une quelconque des revendications 63 à 64 caractérisé en ce que les premier et/ou second et/ou troisième groupes de liaison reliaient, indirectement, respectivement le ferrocène au noyau pyrrole, le ferrocène au polynucléotide sonde, par l'intermédiaire d'un bras de couplage.

20 66. Procédé selon la revendication 65, caractérisé en ce que le bras de couplage est une chaîne hydrocarbonée saturée ayant au moins deux atomes de carbone, de préférence au moins 2 ou 3 atomes de carbone.

25 67. Sonde selon l'une quelconque des revendications 56 à 66, caractérisée en ce que le polynucléotide sonde est fixé au ferrocène par l'intermédiaire respectivement du second et/ou du troisième groupe de liaison et d'au moins une des fonctions aminées du polynucléotide sonde.

FIG 1

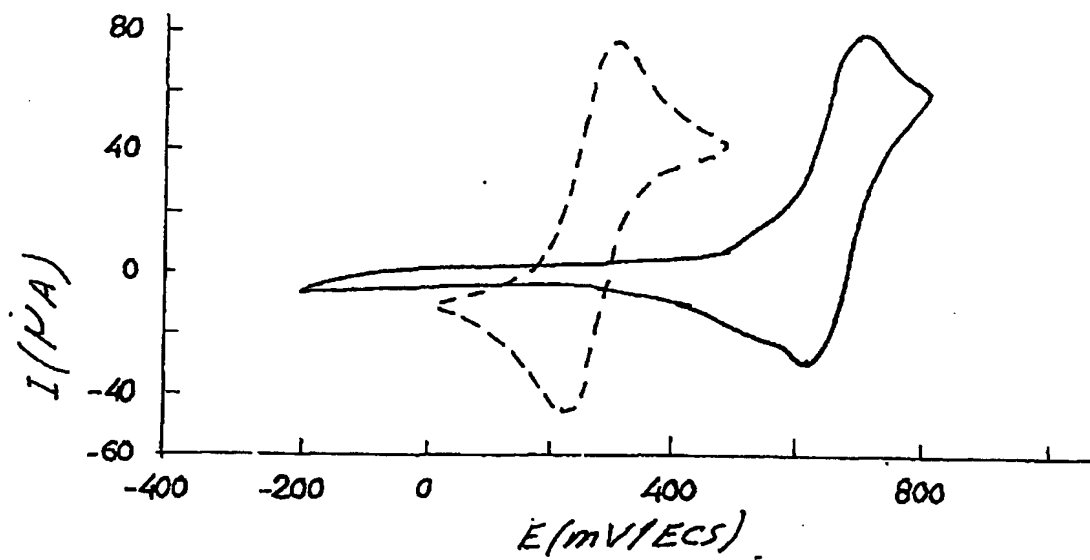
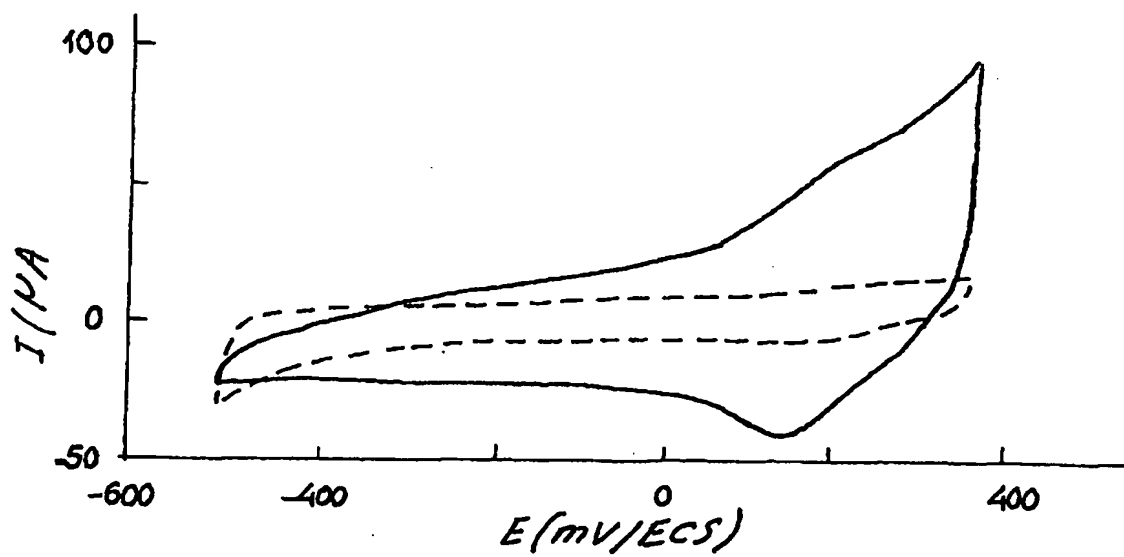


FIG 2



2/8

FIG 3

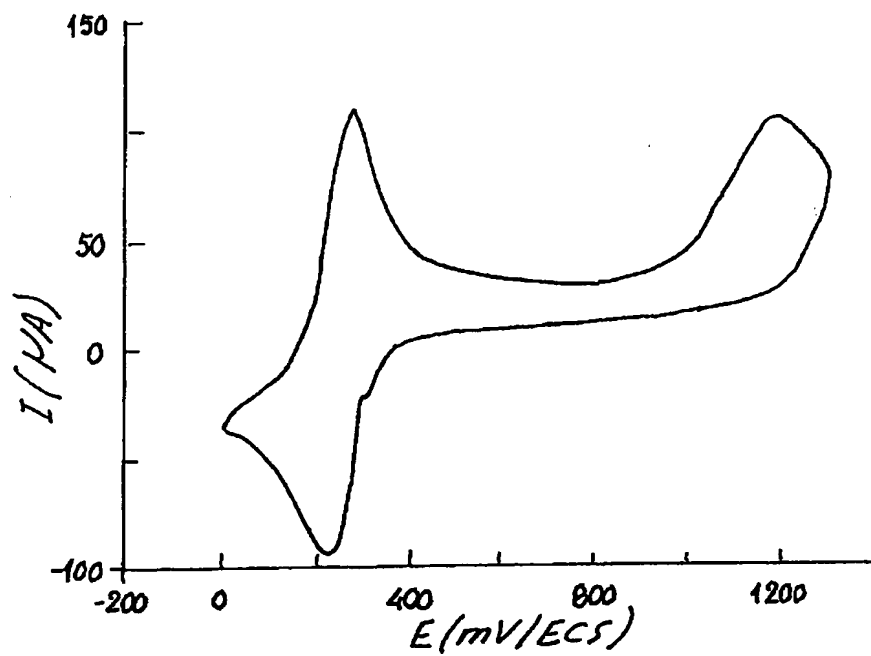
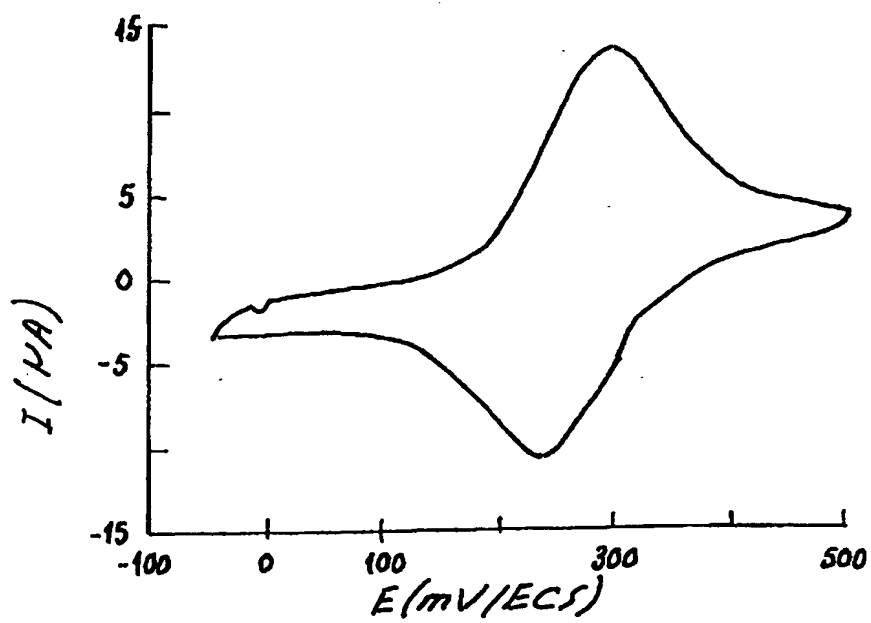


FIG 4



3/8

FIG 5

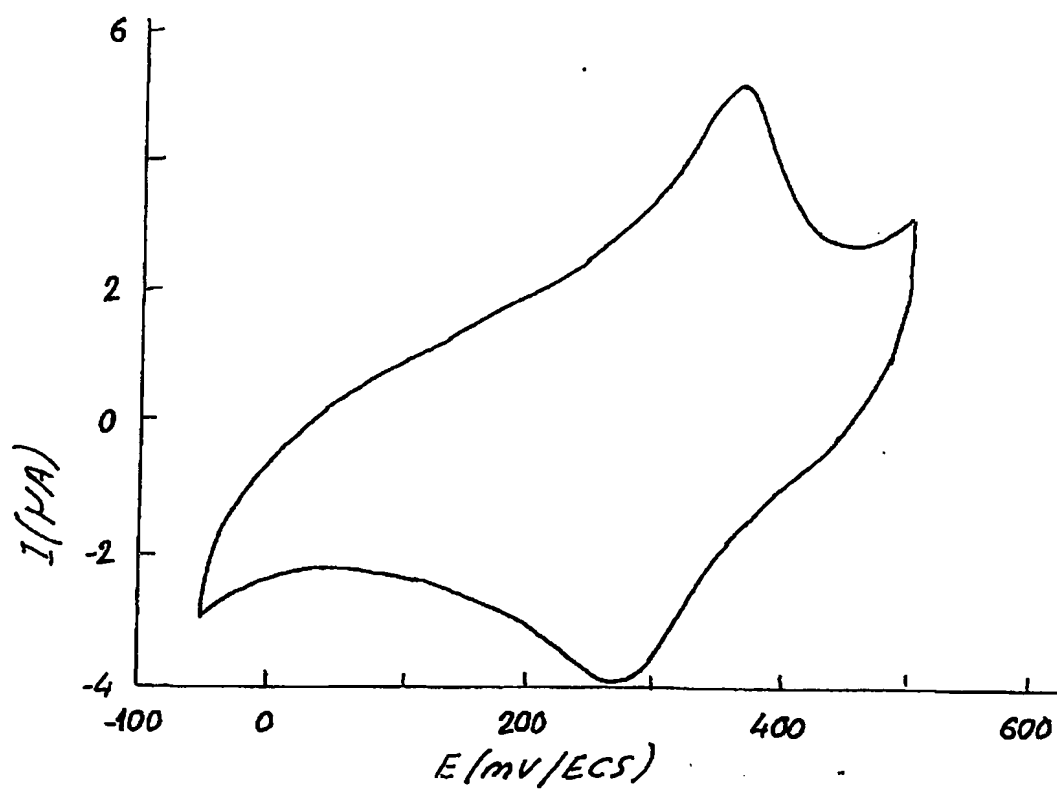
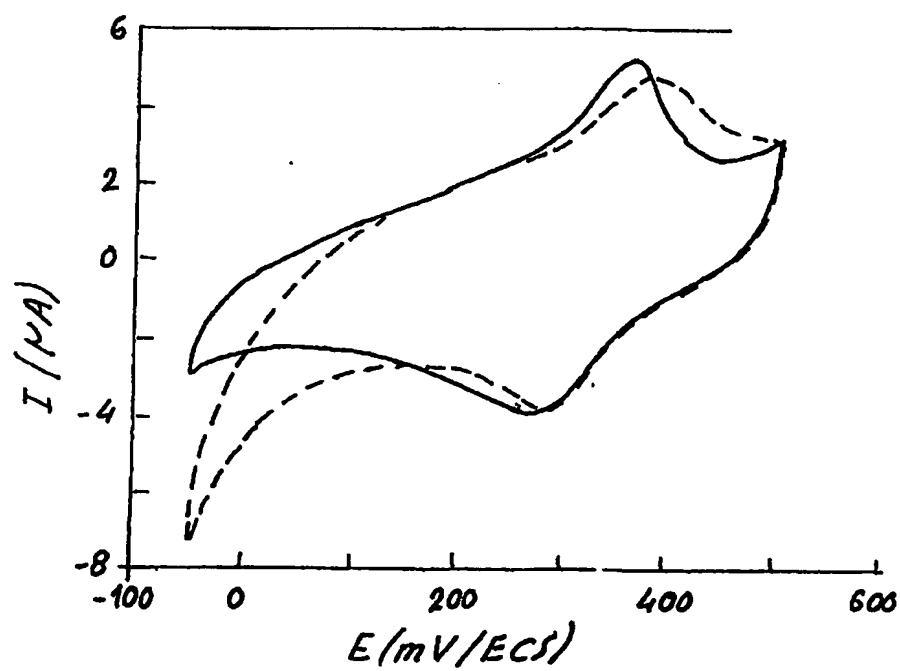


FIG 6



4/8

FIG 8

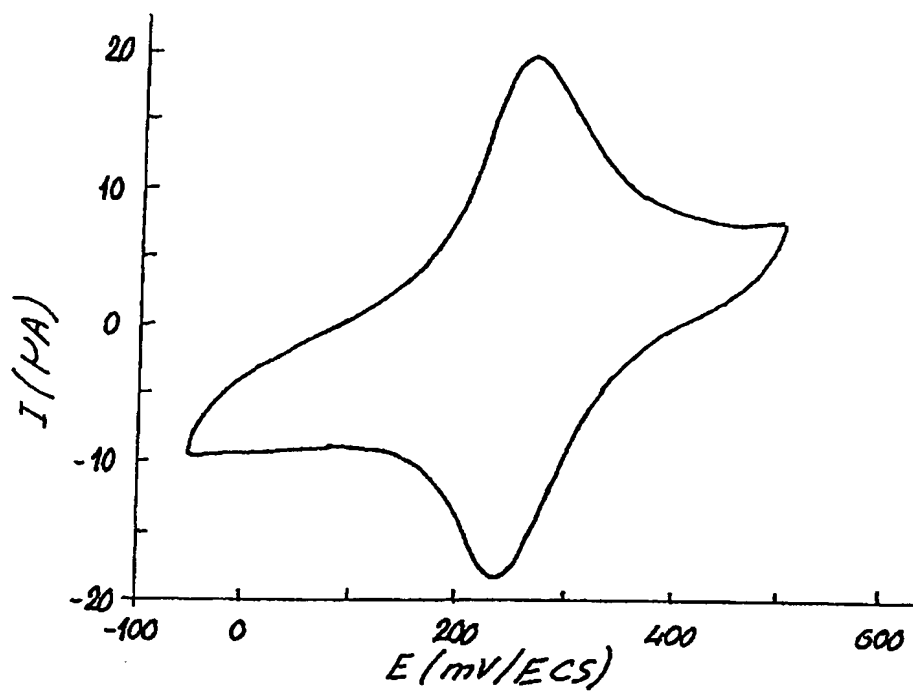
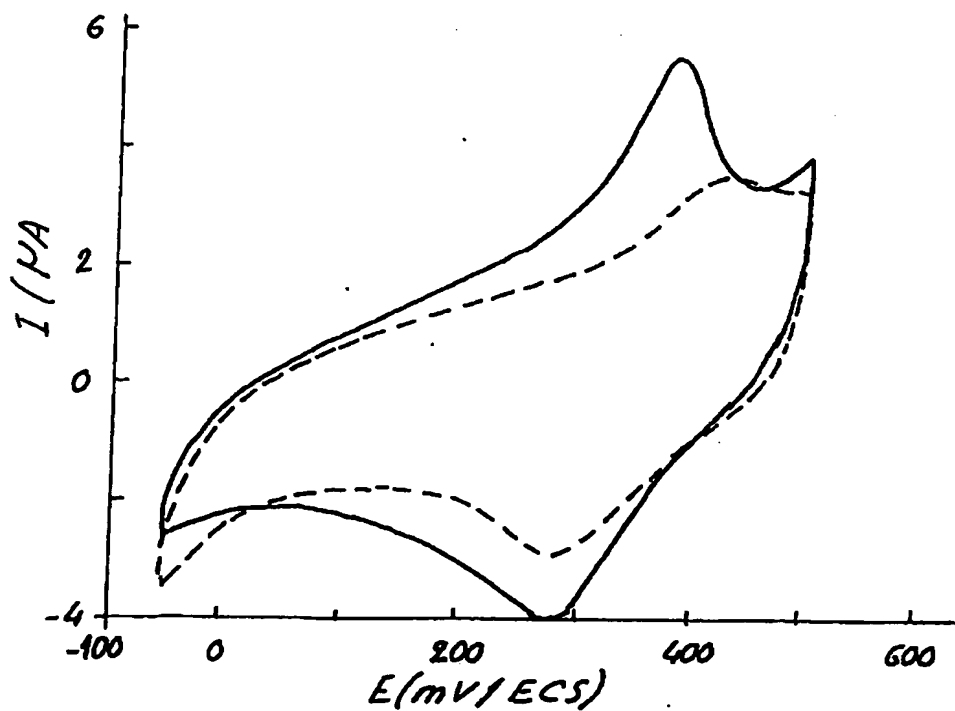


FIG 7



5/8

FIG 9

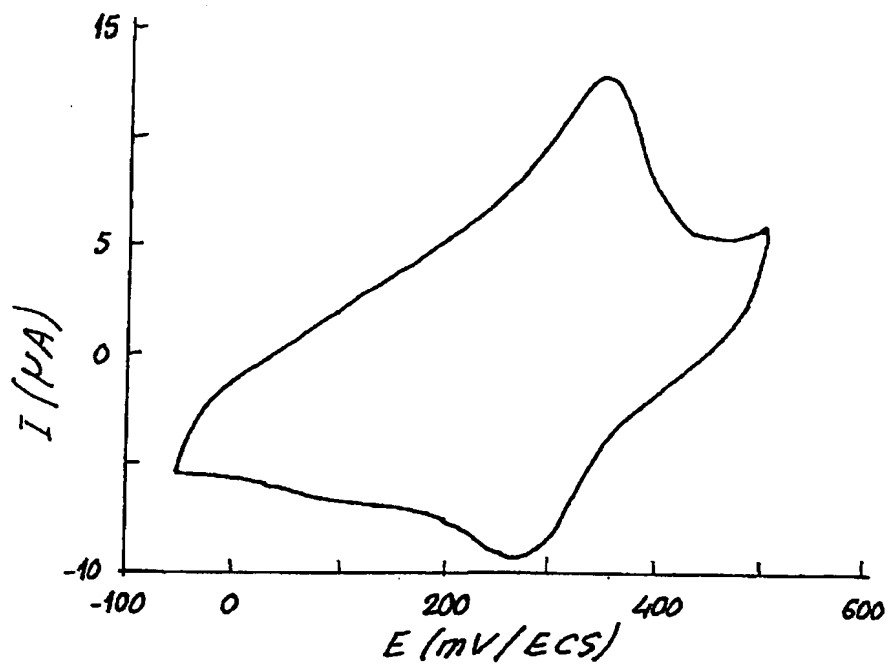
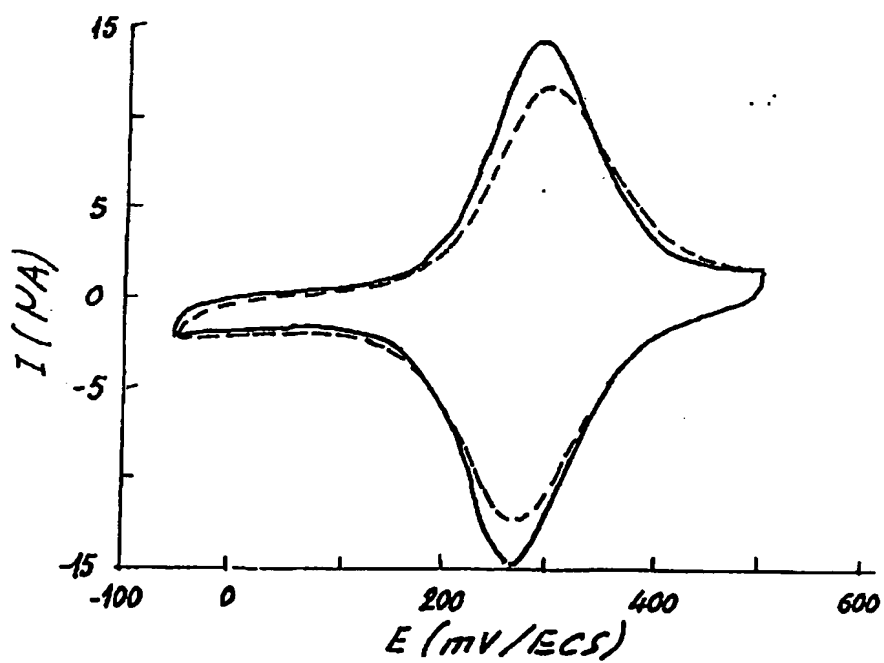


FIG 10



6/8

FIG 11

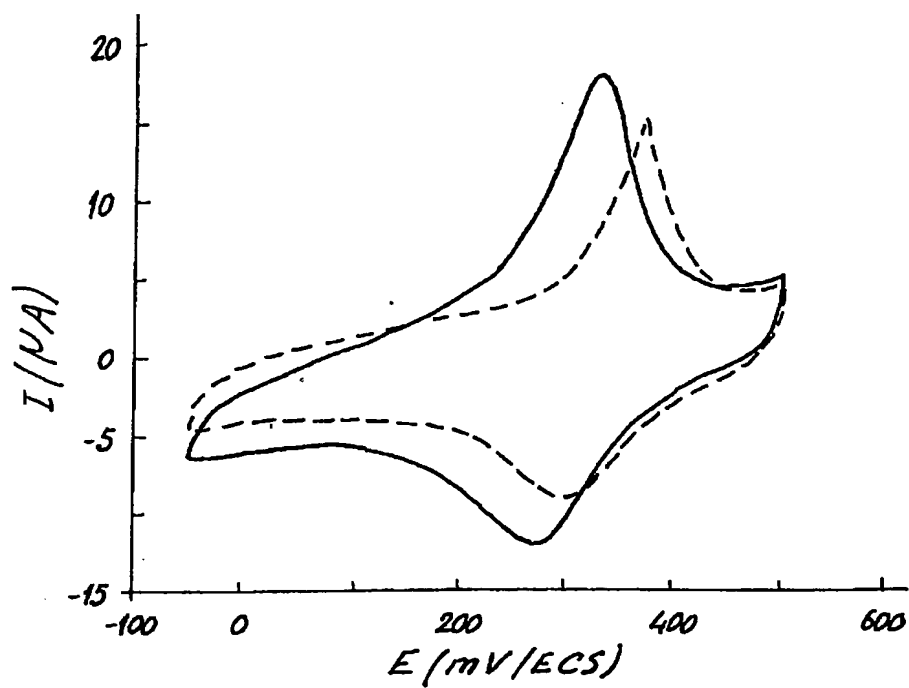
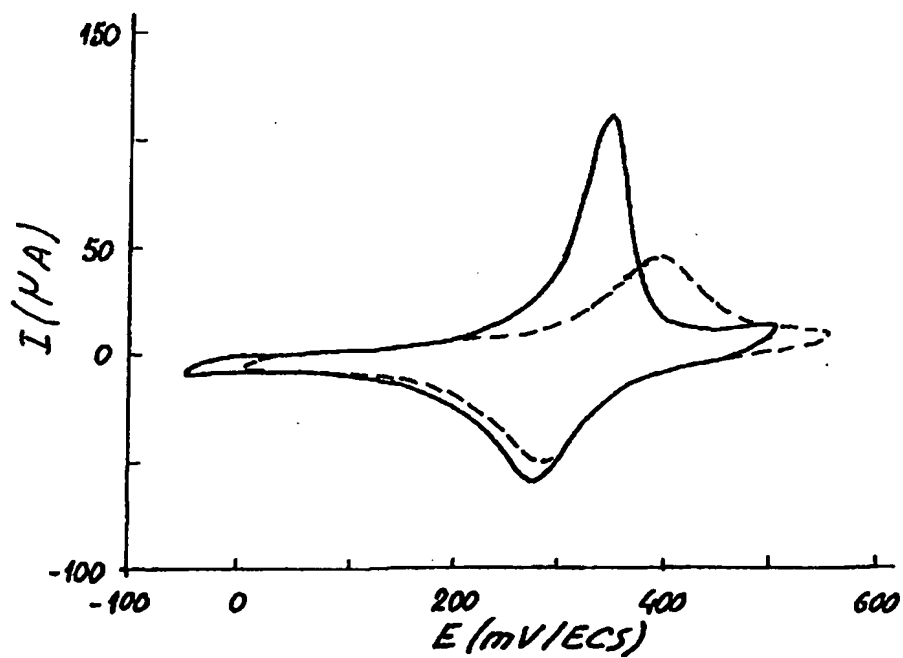
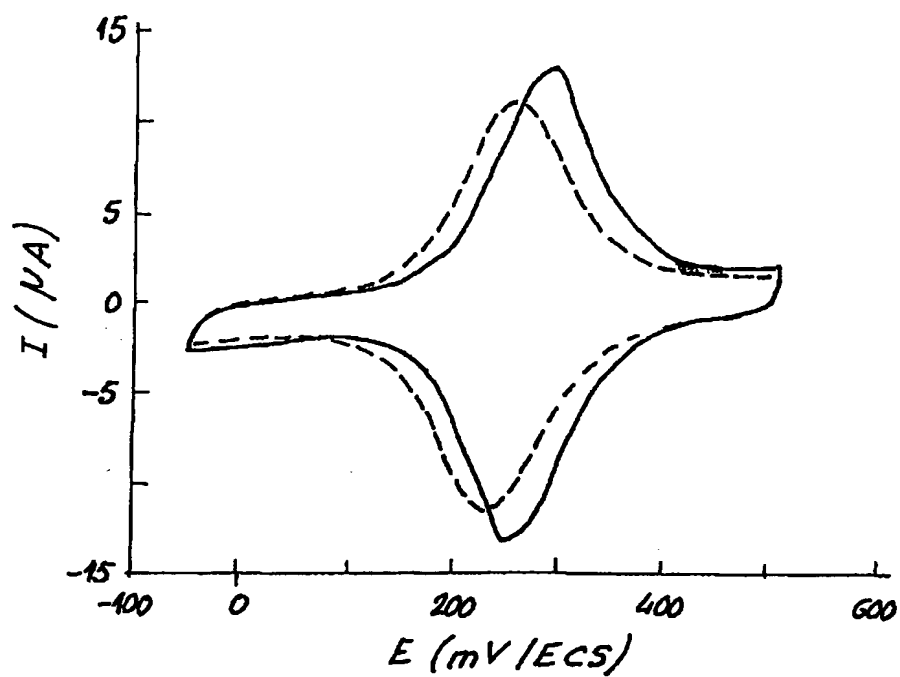


FIG 12



7/8

FIG 13



8/8

FIG 14

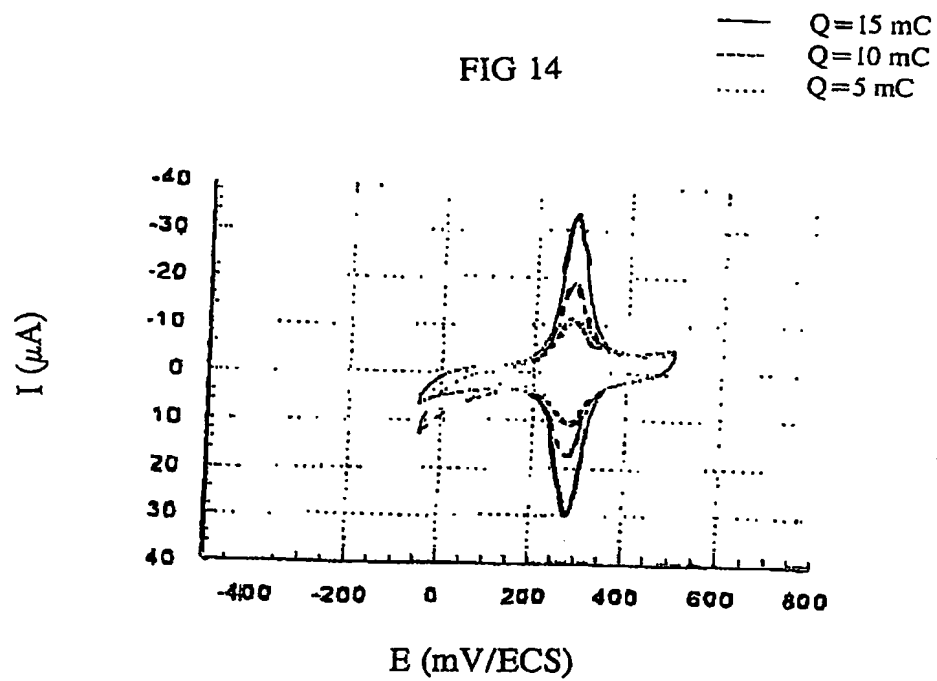
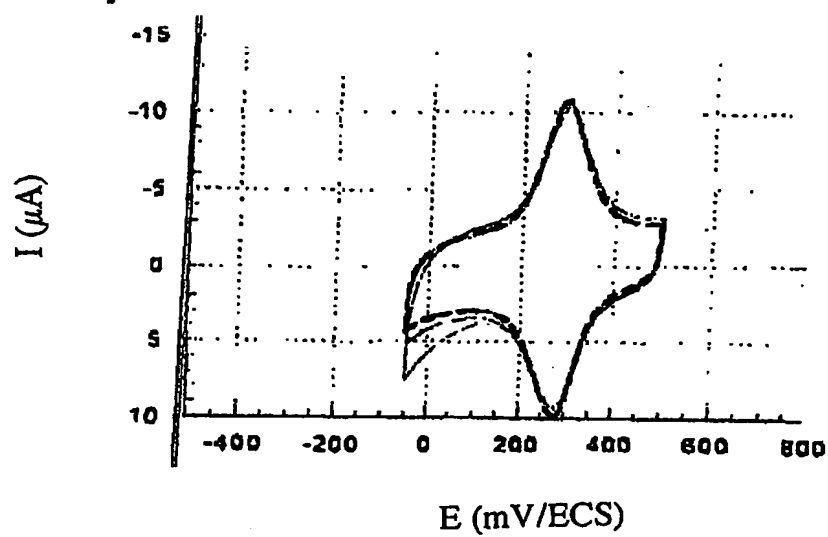


FIG 15



## LISTE DE SEQUENCES

&lt;110&gt; BIO MERIEUX

<120> COMPLEXE ELECTROACTIF, SONDE ELECTROACTIVE ET PROCEDE  
DE PREPARATION

&lt;130&gt; FERROCENES

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;150&gt; FR0005195

&lt;151&gt; 2000-04-21

&lt;160&gt; 2

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description de la séquence artificielle:amorce

&lt;400&gt; 1

tcaatctcgg gaatctcaat gtta

24

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description de la séquence artificielle:amorce

&lt;400&gt; 2

ctaacattga gattcccgag attga

25

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 01/01241

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 C08G61/12 H01B1/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C08G H01B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 00 31750 A (BIO MERIEUX) 2 June 2000 (2000-06-02) claims 1,2,6,10	1-67
A	GARNIER F ET AL: "TOWARD INTELLIGENT POLYMERS: DNA SENSORS BASED ON OLIGONUCLEOTIDE -FUNCTIONALIZED POLYPYRROLES" SYNTHETIC METALS, CH, LAUSANNE, vol. 100, no. 1, 1999, pages 89-94, XP000889886 ISSN: 0379-6779 page 91, column 1, line 9 - line 14	1-67
A	WO 95 29199 A (BIO MERIEUX ; GARNIER FRANCIS (FR)) 2 November 1995 (1995-11-02) cited in the application claims 1,2	1

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 July 2001

Date of mailing of the international search report

16/08/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Paalman, R

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 01/01241

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WO 90 10655 A (ALLAGE ASSOCIATES INC)  20 September 1990 (1990-09-20)  page 27, line 7 - line 11  claims 2,9</p> <p>-----</p>	1

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 01/01241

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0031750 A	02-06-2000	NONE	
WO 9529199 A	02-11-1995	FR 2720832 A	08-12-1995
		CA 2165978 A	02-11-1995
		EP 0705291 A	10-04-1996
		JP 9504334 T	28-04-1997
		US 6201086 B	13-03-2001
		US 6096825 A	01-08-2000
WO 9010655 A	20-09-1990	CA 2048692 A	14-09-1990
		US 5766934 A	16-06-1998
		US 5312762 A	17-05-1994
		US 5352574 A	04-10-1994